

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Zoología y Antropología Física**



**ALGUNOS ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA  
EVOLUTIVA DE LA FAMILIA  
HORMOGASTRIDAE MICHALESEN, 1900:  
FILOGENIA, FILOGEOGRAFÍA Y SELECCIÓN  
SEXUAL.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Marta Novo Rodríguez**

Bajo la dirección de los doctores

Darío J. Díaz Cosín  
Ana Almodóvar Pérez

**Madrid, 2010**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA**



**Algunos aspectos de la Biología Evolutiva de la Familia**  
**Hormogastridae Michaelsen, 1900: Filogenia,**  
**Filogeografía y Selección Sexual**

**Memoria que presenta**  
**MARTA NOVO RODRÍGUEZ**  
**para optar al grado de Doctor**  
**por la Universidad Complutense de Madrid**

**Madrid, 2010**



**DARÍO J. DÍAZ COSÍN Y ANA ALMODÓVAR PÉREZ, PROFESORES DEL  
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGÍA Y ANTROPOLOGÍA FÍSICA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE DE MADRID,**

**CERTIFICAN:**

Que la presente memoria titulada “**Algunos aspectos de la Biología Evolutiva de la Familia Hormogastridae Michaelsen, 1900: Filogenia, Filogeografía y Selección Sexual**”, que para optar al Título de Doctora en Biología presenta Marta Novo Rodríguez, ha sido realizada en el Departamento de Zoología y Antropología Física de la Facultad de CC. Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección. Y considerando que representa trabajo de Tesis, autorizamos su presentación a la Junta de Facultad.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado,

Madrid, Junio de 2010

Darío J. Díaz Cosín

Ana Almodóvar Pérez

Marta Novo Rodríguez





La presente Tesis Doctoral ha sido financiada por una beca de Formación de Personal Universitario (FPU) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia. Asimismo, los estudios realizados han sido financiados por los proyectos nacionales CGL2004-00943/BOS y CGL2007-60715/BOS.



A mis padres y a mi hermana



## Agradecimientos

Han sido años esperando este momento que parecía que no iba a llegar nunca. Durante todo este tiempo me habéis apoyado muchos, algunos me habéis ayudado a recorrer una parte del camino y otros habéis sido mi bastón durante todo el trayecto, guiándome, evitando mis tropiezos o ayudándome a continuar después de mis caídas. A todos, muchísimas gracias, porque yo sola no habría llegado hasta aquí.

Aún recuerdo con nitidez el día en el que renuncié a mi vocación por la biología marina, mi primera reunión con Darío. Sentados cara a cara, tú me contabas tus ideas, relatabas tus hipótesis, me contagiabas con tu sed de conocer. Me conquistaste. Y desde entonces, no me he arrepentido ni un solo minuto de haberme quedado en este grupo, donde a través de las lombrices de tierra, y gracias a vosotros, he aprendido tanto. Gracias por tu confianza ciega y por darme todas las oportunidades que han estado en tu mano. Eres un ejemplo a seguir como científico, profesor y persona.

Un problema para una persona con formación zoológica como yo, es el miedo a enfrentarse a las herramientas moleculares. Si no fuera por Ana, esto habría sido imposible. Gracias por hacerme mucho más fácil el camino y guiarme a través del mundo molecular, por todas las horas que te has sentado conmigo, por tu esfuerzo para cambiar totalmente de tercio con las lombrices y por tu confianza en mí.

Una Tesis no se hace de la misma manera si uno no se siente como en casa. Y yo he tenido la suerte de tener esa sensación. Gracias a Dolores y Juan y a mis “hermanas mayores” Marta y Mónica, por crear tan buen ambiente, por ayudarme y aconsejarme siempre que lo he necesitado. Rosa, definitivamente esta Tesis no habría sido posible sin tí. Gracias por dejarte la piel en todos los muestreos, sin condiciones. He disfrutado muchísimo teniéndote de compañera lombricera y espero que así sea por muchos años, y que sean muchas más paladitas y muchos más kilómetros.

Gracias a todos los profesores del Departamento, donde he estado trabajando tan a gusto, especialmente a Carmen, Jesús y Fernando, por amenizar el día a día con sus innumerables visitas. Gracias Carmen por tu ayuda con la histología y con el papeleo. Gracias Fernando por la elaboración de la ilustración de *H. abbatissae*. Gracias Javi e Isabel por vuestra alegría contagiosa.

En las plantas ocho y nueve también tengo una pequeña familia. Muchísimas gracias a todos los becarios por el buen ambiente, tan necesario cuando uno pasa tantísimas horas en la Facultad. Especialmente tengo que agradecerle, Sheila, que me hayas enseñado en el laboratorio con tanta paciencia y que me hayas dedicado todo el tiempo que ha sido necesario. Ojalá hubiera más gente como tú. Dani, muchísimas gracias por tus consejillos y por dedicarme tu tiempo elaborando los mapas. Irene, muchas gracias por tu ayuda con el Estadística, con el inglés y con todo lo que ha estado en tu mano (qué haría sin ti).

Gracias a todos los que en algún momento habéis puesto vuestro granito de arena para mejorar esta Tesis. Gracias a Rocío Pérez Portela por tus consejos sobre microsatélites, a Maigualda Ricoy por enviarnos material de Alghero y por tu ayuda en la selección y optimización de los genes, a Pablo Porto por nuestras conversaciones sobre selección sexual, a los alumnos del proyectito de histología por cedermme vuestras fotografías, a Pietro Omodeo por enviarnos material de diferentes localidades. Gracias también a aquellos que habéis ofrecido vuestros brazos para los muestreos en alguna ocasión: Carlos, Noa, Juanjo, Inés, Pablo y Ester.

I am indebted to Nico Michiels for giving me the opportunity to work in his lab at Tübingen University during four months. Thanks to all the people from his lab for their technical and personal support. I can say that I really learnt a lot from all of you and had also a great time there. Vielen dank für alles! Special thanks to T.P. Velavan for collaborating with me and teaching me everything on microsatellites. I would have needed much more time if I had had to do that work on my own. Muchísimas gracias Bea por ser mi familia en Alemania. Si no fuera por tí la estancia no habría sido lo mismo.

I am also indebted to Gonzalo Giribet who kindly accepted me in his lab at Harvard University during four months. I express my gratitude to him and all the members of his lab for their guidance, their help in molecular and phylogenetic analyses, and the great atmosphere. Gracias a toda la tribu española por estar ahí y compartir todos nuestros problemas, científicos y personales. Cuando uno está tan lejos de casa, eso no tiene precio.

Para llegar a este punto en el ámbito académico es imprescindible la vida más allá de la Tesis. Gracias a todos los amigos y familiares que habéis vivido el día a día, habéis aguantado mis historias lombriceras y habéis llegado a comprender que me guste estudiar estos bichitos. Gracias Irene, Peri y Ana por haberme demostrado lo que es la verdadera amistad. Gracias Carlos por haberme acompañado en parte de este camino, por toda tu ayuda y por los buenos momentos. Gracias a mis abuelos que nunca han dudado que sus nietos somos los mejores hagamos lo que hagamos. Gracias a las niñas de Ribadeo, a mis chicos y chicas de la Vega, a las niñas del CEU, a los capoeeristas y a todos los biólogos y biopalos. Gracias a todos los que me habéis demostrado vuestro cariño, sobre todo en este trayecto final. Sois tantos que es imposible nombraros a todos.

La última canción de un concierto siempre es la mejor. Y lo mejor que me ha pasado en esta vida es mi familia, a la que dedico esta Tesis. Gracias a mi hermana por estar siempre ahí, e incluso dar unas paladitas para buscar hormogástridos. Gracias a mis padres por ser mi ejemplo a seguir, por apoyarme siempre, por animarme a hacer lo que me gusta y por ayudarme en todo lo que habéis podido. Gracias mamá por tus aportaciones e ideas logísticas y gracias papá por tus consejos sobre este mundo universitario y científico tan complicado.

## SERÁS HOMBRE...

*Si guardas, en tu puesto, la cabeza tranquila  
cuando todo a tu lado es cabeza perdida.  
Si tienes en tí mismo una fe que te niegan  
y no desprecias nunca las dudas que ellos tengan.  
Si esperas en tu puesto sin fatiga en la espera,  
si, engañado, no engañas, si no buscas más odio  
que el odio que te tengan...  
Si eres bueno y no finges ser mejor de lo que eres;  
si al hablar no exageras lo que sabes y quieres.*

*Si sueñas y los sueños no te hacen su esclavo;  
si piensas y rechazas lo que piensas en vano.  
Si tropiezas el Triunfo, si llega tu Derrota,  
y a los dos impostores los tratas de igual forma.  
Si logras que se sepa la verdad que has hablado,  
a pesar del sofisma del Orbe encanallado.  
Si vuelves al comienzo de la obra perdida,  
aunque esta obra sea la de toda tu vida.*

*Si arriesgas en un golpe y lleno de alegría  
tus ganancias de siempre a la suerte de un día,  
y pierdes, y te lanzas de nuevo a la pelea  
sin decir nada a nadie de lo que es y lo que era.  
Si logras que tus nervios y el corazón te asistan  
aún después de su fuga de tu cuerpo en fatiga  
y se agarren contigo cuando no quede nada,  
porque tu lo deseas y lo quieres y lo mandas.*

*Si hablas con el pueblo y guardas tu virtud.  
Si marchas junto a Reyes con tu paso y tu luz.  
Si nadie que te hiera, llega a hacerte la herida.  
Si todos te reclaman y ni uno te precisa.  
Si llenas el minuto inolvidable y cierto  
de sesenta segundos que te lleven al cielo...  
Todo lo de esta tierra será de tu dominio,  
y mucho más aún: serás Hombre hijo mío.*

**JOSEPH RUDYARD KIPLING**

Bombay 1865-Londres 1936  
Premio Nobel de Literatura en 1907





<b><u>Resumen/Summary</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I. Introducción</u></b>	<b>13</b>
I.1. Lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae	18
I.2. El caso concreto de <i>Hormogaster elisae</i>	27
I.3. Selección sexual en lombrices de tierra hermafroditas de fecundación cruzada	30
I.3.1. Selección sexual previa a la cópula	31
I.3.2. Selección sexual posterior a la cópula	34
I.4. Uso de marcadores moleculares en lombrices de tierra	39
I.5. Objetivos	47
<b><u>II. Diseño de cebadores para amplificar regiones microsatélite en la lombriz de tierra <i>Hormogaster elisae</i></u></b>	<b>51</b>
II.1. Introducción	54
II.2. Materiales y métodos y resultados	54
II.2.1. Extracción de ADN	55
II.2.2. Digestión con enzimas de restricción	55
II.2.3. Unión a adaptadores	57
II.2.4. Enriquecimiento	59
II.2.5. Clonación y secuenciación	61
II.2.5.a. Preparación del inserto y unión al vector	61
II.2.5.b. Transformación	62
II.2.5.c. Selección de clones con el inserto	63
II.2.5.d. Extracción de plásmidos	63
II.2.6. Diseño de cebadores	64
II.2.7. Optimización de las condiciones de PCR y comprobación de la variabilidad de los marcadores	64
<b><u>III. Selección de pareja de <i>Hormogaster elisae</i> en una parcela de El Molar (Madrid)</u></b>	<b>71</b>
III.1. Introducción	74
III.2. Materiales y métodos	77
III.2.1. Muestreo y disección de lombrices	77
III.2.2. Análisis de fragmentos microsatélites	79
III.2.3. Análisis genético a nivel microgeográfico	80

III.2.4. Análisis de selección de pareja.....	80
<b>III.3. Resultados.....</b>	<b>82</b>
III.3.1. Análisis genético microgeográfico.....	82
III.3.2. Análisis de selección de pareja.....	84
<b>III.4. Discusión.....</b>	<b>86</b>
III.4.1. Análisis genético microgeográfico.....	86
III.4.2. Selección de pareja.....	87
III.4.3. Conclusiones.....	88
<b><u>IV. Estudio de la variabilidad genética de <i>Hormogaster elisae</i>.....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b>IV.1. Introducción.....</b>	<b>93</b>
<b>IV.2. Materiales y métodos.....</b>	<b>95</b>
IV.2.1. Recogida de muestras y estudio morfológico.....	95
IV.2.2. Amplificación de ADN.....	98
IV.2.3. Análisis de datos.....	99
IV.2.3.a. Variación inter e intrapoblacional.....	99
IV.2.3.b. Relaciones filogenéticas.....	100
IV.2.3.c. Historia demográfica.....	101
<b>IV.3. Resultados.....</b>	<b>103</b>
IV.3.1. Características morfológicas.....	103
IV.3.1.a. Morfología externa.....	103
IV.3.1.b. Anatomía interna.....	105
IV.3.2. Variación de la secuencia.....	111
IV.3.3. Variación inter e intrapoblacional.....	112
IV.3.4. Relaciones filogenéticas.....	115
IV.3.5. Historia demográfica.....	118
<b>IV.4. Discusión.....</b>	<b>123</b>
IV.4.1. Variación de la secuencia y características morfológicas.....	123
IV.4.2. Variación inter e intrapoblacional.....	124
IV.4.3. Relaciones filogenéticas.....	127
IV.4.4. Historia demográfica.....	129
IV.4.5. Conclusiones.....	130
<b><u>V. Especiación crítica de hormogástridos revelada por datos     mitocondriales y nucleares.....</u></b>	<b><u>133</u></b>

<b>V.1. Introducción</b>	<b>137</b>
<b>V.2. Materiales y métodos</b>	<b>139</b>
V.2.1. Muestreo y estudio morfológico	139
V.2.2. Evaluación de factores ambientales	140
V.2.3. Extracción de ADN, amplificación de genes y secuenciación	143
V.2.4. Análisis de datos	143
V.2.4.a. Análisis de genética de poblaciones	143
V.2.4.b. Redes de haplotipos	146
V.2.4.c. Relaciones filogenéticas	146
<b>V.3. Resultados</b>	<b>148</b>
V.3.1. Características morfológicas	148
V.3.2. Relaciones entre distancias genéticas y tamaño corporal o propiedades del suelo	148
V.3.3. Características de la secuencia y diversidad genética	149
V.3.4. Divergencia genética y estructura poblacional	150
V.3.5. Redes de haplotipos	155
V.3.6. Relaciones filogenéticas	157
V.3.7. Diferenciación entre especies propuestas	160
<b>V.4. Discusión</b>	<b>161</b>
V.4.1. Un único evento de colonización	161
V.4.2. Diversificación de nivel específico	163
V.4.3. Especiación críptica	165
V.4.4. ¿Cuál es la causa de las altas divergencias?	167
<b><u>VI. Filogenia de la Familia Hormogastridae basada en datos moleculares</u></b>	<b>169</b>
<b>VI.1. Introducción</b>	<b>173</b>
<b>VI.2. Materiales y métodos</b>	<b>174</b>
VI.2.1. Muestreo y estudio morfológico	174
VI.2.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación	181
VI.2.3. Análisis de datos moleculares	182
VI.2.3.a. Variabilidad genética	182
VI.2.3.b. Relaciones filogenéticas	184
VI.2.3.c. Estima de tasas moleculares y tiempos de divergencia	187
VI.2.4. Evaluación de factores del suelo	188

<b>VI.3. Resultados</b>	<b>189</b>
VI.3.1. Características morfológicas	189
VI.3.2. Datos moleculares	195
VI.3.2.a. Características de los genes utilizados y variabilidad genética	195
VI.3.2.b. Relaciones filogenéticas	197
VI.3.2.c. Estima de tasas moleculares y tiempos de divergencia	204
VI.3.3. Evaluación de factores del suelo	205
<b>VI.4. Discusión</b>	<b>209</b>
VI.4.1. Consideraciones generales	209
VI.4.2. El problema de las tasas de sustitución	215
VI.4.3. Relación con los factores ambientales	216
<b><u>VII. Algunas propuestas para una nueva taxonomía de la Familia</u></b>	
<b><u>Hormogastridae a la luz de su filogenia y morfología</u></b>	<b>219</b>
VII.1. Introducción	222
VII.2. El sistema de géneros en los hormogástridos	222
VII.2.1. <i>Vignysa</i>	223
VII.2.2. <i>Xana</i>	223
VII.2.3. <i>Hemigastrodrilus</i>	225
VII.3. El caso de <i>Hormogaster elisae</i> : <i>Gatodrilus</i> , un nuevo género de lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae	226
VII.4. <i>Hormogaster pretiosa</i> , un rompecabezas taxonómico	228
VII.4.1. ¿Qué es <i>Hormogaster pretiosa</i> ?	228
VII.4.1. ¿Qué es <i>Hormogaster pretiosa</i> de la Península Ibérica y sur de Francia?	233
VII.5. Las restantes especies del este de España y sur de Francia	235
VII.5.1. <i>Hormogaster pretiosiformis</i> y <i>Hormogaster oroeli</i>	235
VII.5.2. <i>Hormogaster eserana</i> y material de Peralba	236
VII.5.3. <i>Hormogaster arenicola</i>	238
VII.5.4. Las formas de La Rioja: <i>Hormogaster riojana</i> y <i>Hormogaster ireguana</i>	239
VII.5.5. <i>Hormogaster gallica</i> y <i>Hormogaster catalaunensis</i>	240
VII.6. Las formas orientales: <i>Hormogaster redii</i> y <i>Hormogaster samnitica</i>	242
<b><u>VIII. <i>Hormogaster abbatissae</i>, nueva especie de Hormogastridae</u></b>	
<b><u>procedente de Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España)</u></b>	<b>247</b>
VIII.1. Introducción	250

<b>VIII.2. Materiales y métodos</b> .....	<b>251</b>
<b>VIII.3. Resultados</b> .....	<b>252</b>
VIII.3.1. Descripción .....	<b>252</b>
VIII.3.1.a. Morfología externa .....	252
VIII.3.1.b. Anatomía interna .....	254
VIII.3.1.c. Caracteres moleculares .....	255
<b>VIII.4. Discusión</b> .....	<b>255</b>
<b><u>IX. Discusión y conclusiones/Conclusions</u></b> .....	<b>259</b>
<b><u>X. Bibliografía</u></b> .....	<b>273</b>
<b><u>XI. Anexos</u></b> .....	<b>313</b>



## **Resumen/Summary**





## Resumen

La presente Tesis Doctoral pretende hacer una aproximación a distintos aspectos de la Biología Evolutiva de las lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae. Para ello, se hace uso de técnicas moleculares que permiten responder a preguntas difíciles de abarcar usando técnicas tradicionales.

El marco de estudio tiene distintas escalas y la Tesis se podría dividir así en tres partes:

### **1) Estudio microgeográfico y selección sexual de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 en El Molar (capítulos II y III)**

En primer lugar, la Tesis se centra en el estudio genético de una población concreta de *H. elisae* (capítulo III), en el que además de inferir el movimiento de las lombrices dentro de una parcela para buscar compañero de cópula, se estudian patrones de selección sexual. El estudio se centra tanto en los patrones de selección previos a la cópula (selección por tamaño) como posteriores a la misma (compartimentación del esperma en las espermatecas). Se conocen pocos detalles de la biología reproductiva de un grupo zoológico tan importante en el funcionamiento de los suelos como son las lombrices de tierra. Y el hecho de que vivan en un medio tan críptico imposibilita la observación directa de su comportamiento. Por tanto, son necesarias herramientas genéticas especiales, como los loci microsatélites. Este tipo de marcadores son muy específicos y los cebadores diseñados para un grupo no suelen funcionar para otros. Por ello, en esta Tesis también se han localizado diez regiones microsatélite en el genoma de *H. elisae* y se han diseñado cebadores para su amplificación (capítulo II). Como principales resultados de este apartado se puede decir que los individuos de *H. elisae* copulan generalmente con dos parejas, preferentemente del mismo tamaño, que encuentran en la cercanías. No se ha observado almacenamiento diferencial del esperma procedente de diferentes individuos.

## **2) Filogeografía de *Hormogaster elisae* y especiación críptica (capítulos IV y V)**

Este apartado se centra en una especie endémica del centro de la Península Ibérica, *H. elisae*, que parece estar en un claro proceso de especiación. En el capítulo IV se han estudiado las relaciones genéticas entre siete de sus poblaciones así como su historia demográfica. Se incluyen descripciones morfológicas detalladas y el análisis del gen mitocondrial utilizado como código de barras (COI). Los resultados de este estudio preliminar, en el que se detectan valores de divergencia genética entre poblaciones muy altos a pesar de una gran constancia morfológica, dan pie a realizar un estudio más intensivo para detectar especiación críptica (capítulo V), analizando fragmentos génicos mitocondriales (COI, 16S y tRNAs) y nucleares (28S) en 16 poblaciones. Se propone la presencia de cinco especies crípticas dentro del complejo de *H. elisae*, y se encontraron correlaciones positivas entre las divergencias genéticas y algunas características del suelo (arena gruesa y limo total) así como un patrón de aislamiento por distancia.

## **3) Filogenia molecular de Hormogastridae Michaelsen, 1900 (capítulos VI, VII y VIII)**

La Familia Hormogastridae, está formada por cuatro géneros y 22 especies de lombrices de tierra de tamaño medio a grande, distribuidas casi exclusivamente en el área del Mediterráneo occidental. Se conoce muy poco sobre su filogenia, existiendo exclusivamente descripciones morfológicas de las distintas especies y no existen prácticamente contribuciones utilizando técnicas moleculares. En esta Tesis se han recogido ejemplares de casi todas las especies, para completar las descripciones existentes y reconstruir su filogenia desde el punto de vista molecular (capítulo VI), amplificando regiones nucleares (18S, 28S, histona H3 e histona H4) y mitocondriales (COI, 16S y tRNAs). Se realiza una calibración del árbol, utilizando la separación de la microplaca de Cerdeña para calcular el momento de diversificación de la Familia que comenzó hace 97-75 millones de años y las tasas de sustitución específicas para COI, que resultaron ser variables y específicas de clado. A la luz de los resultados, contradictorios con la ordenación taxonómica existente hasta el momento se propone una reorganización de la taxonomía de los hormogástridos (capítulo VII) y se describe una nueva especie para la ciencia (capítulo VIII).

## Summary

The present Phd dissertation studies different aspects of the Evolutionary Biology of Hormogastridae earthworms. Molecular techniques are used and permit to answer questions that would be impossible to cover by traditional methods.

The study has different scales of approaching and the dissertation could be divided in three main sections:

### **1) Microgeographical study and sexual selection of *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 in El Molar (chapters II and III)**

In this first section, the dissertation focuses on the genetic study of a concrete population of *H. elisae* (chapter III). Besides trying to infer the movement capacity of the earthworms to seek a partner within a plot, sexual selection patterns are investigated. The study focuses not only on precopulatory sexual selection patterns (body size selection) but also on postcopulatory sexual selection processes (sperm separation in spermathecae). Few details are known about the reproductive biology of this zoological group, which is very important for the functioning of the soils. The fact that earthworms live in such a cryptic medium, makes the direct observation of their behaviour almost impossible. Therefore, special genetic tools are needed, such as microsatellite markers. They are very specific and the primers designed for one group normally do not work for others. That is the reason why in the present dissertation ten microsatellite regions are located in the genome of *H. elisae* and some primers were designed for its amplification (chapter II). The main results of this section indicated that *H. elisae* mate normally with two partners, preferably of the same size, that it finds in the neighbourhood. There were no signs of differential storage of sperm from different partners.

## **2) Phylogeography and cryptic speciation of *Hormogaster elisae* (chapters IV and V)**

This section focuses on an endemic species to the central area of the Iberian Peninsula, *H. elisae* that seems to be undergoing speciation processes. In chapter IV the genetic relationships among seven of its populations are studied and also its demographic history. Detailed morphological descriptions and the analysis of the barcoding mitochondrial gene COI are included. The results of this preliminar study, in which very high values of genetic divergence are found among populations in spite of a morphological constancy, led into a more intensive work to detect cryptic speciation (chapter V) by analysing mitochondrial (COI, 16S rRNA and tRNAs) and nuclear (28S rRNA) genes in 16 populations. The presence of five cryptic species within *H. elisae* complex is proposed, and a positive correlation was found between some soil properties (coarse sand and total loam content) and genetic distances and also a pattern of isolation by distance was detected.

## **3) Molecular phylogeny of Hormogastridae Michaelsen, 1900 (chapters VI, VII and VIII)**

The Family Hormogastridae consists of four genera and 22 species of large and middle-sized earthworms distributed almost exclusively in the countries and islands of the western Mediterranean. Little is known about its phylogeny other than morphological species descriptions and one allozyme study. In the present work, individuals representing almost all of the hormogastrid species were collected, in order to complete the existing descriptions and reconstruct the phylogeny from a molecular point of view (chapter VI). Mitochondrial (COI, 16S rRNA and tRNAs) and nuclear (18S rRNA, 28S rRNA, histone H3 and histone H4) regions were amplified to achieve this aim. The tree was calibrated, by using the separation of the Sardinian microplate, to calculate the diversification timing of the Family, which started from 97 to 75 MY ago. The specific substitution rates of COI resulted to be very variable and clade-specific. As a consequence of the results, which showed contradictions with the current taxonomic classification of this Family, some changes in Hormogastridae taxonomy are suggested (chapter VII) and a new species for the scientific community is described (chapter VIII).

## **I. Introducción**

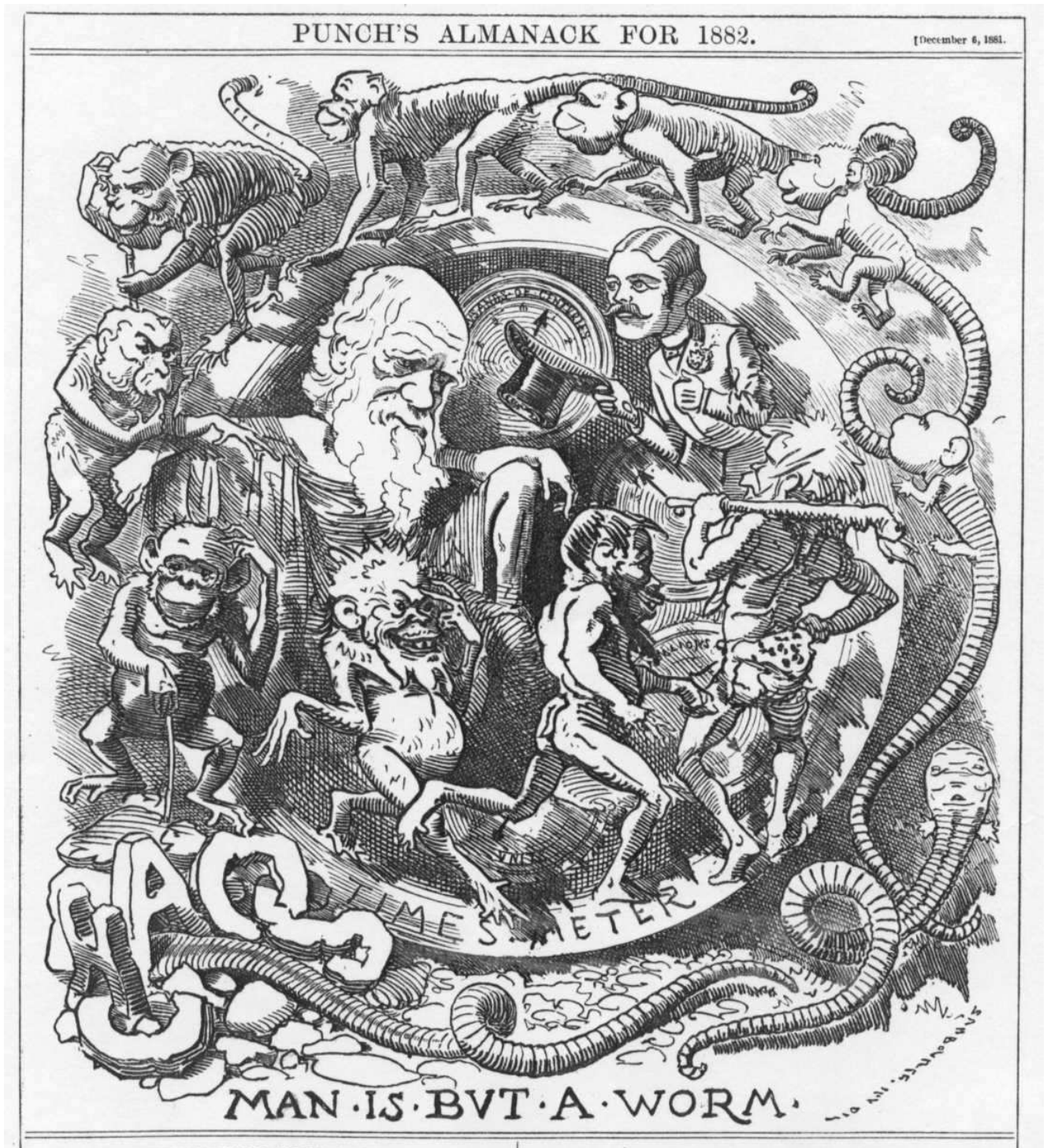


## I. Introducción

Las lombrices de tierra representan la principal zoomasa del suelo en los países templados. Esta enorme biomasa desempeña un papel crucial en los ciclos biogeoquímicos del suelo tanto por su efecto directo como por las relaciones interbiológicas y efectos indirectos sobre otros grupos de organismos edáficos (Edwards y Bohlen 1996).

La importancia de las lombrices de tierra es conocida desde la antigüedad. Aristóteles ya hablaba de ellas como “intestinos de la tierra”, los Babilonios las utilizaban en medicina, y en el antiguo Egipto fueron estudiadas por algunos sacerdotes y consideradas como animales sagrados en época de Cleopatra, hasta tal punto que los granjeros egipcios no las eliminaban del suelo por miedo a disminuir la fertilidad de sus tierras a lo largo del Valle del Nilo (Brown *et al.* 2003). Estas tierras eran periódicamente fertilizadas por los aportes orgánicos dejados por las crecidas del río, y éstos a su vez, incorporados y mezclados con el suelo por las lombrices. En plena Edad Moderna, Georg Bauer, en 1549 y el naturalista Gilbert White en 1789, destacaron la importancia de las lombrices de tierra (Graff 1983, Feller *et al.* 2000). Pero es con las aportaciones de Charles Darwin, cuando se produce una auténtica revolución en el estudio de las lombrices de tierra concediéndoles un papel esencial en la fertilidad y formación del suelo y del humus. Ya en su primera publicación (Darwin 1838), éste describía las actividades de las lombrices de tierra, lo que fue el tema central de su presentación a la Sociedad Geológica en 1837 (Stürzenbaum *et al.* 2009). Pero mucho más importante fue su último libro: “The formation of vegetable mould through the action of worms” (Darwin 1881). Este libro está basado en centenares de horas de observaciones en el campo y aprecia el importantísimo papel de las lombrices de tierra en la incorporación de la hojarasca al suelo y en la mezcla de la materia orgánica con los componentes minerales. Una caricatura publicada en “Punch Magazine” el 6 de diciembre de 1881 representa a Darwin rodeado de una serie de imágenes que comienzan en una lombriz de tierra saliendo del caldo de cultivo primordial que evoluciona a un mono y a un humano representado por el mismo Darwin (Figura I.1).





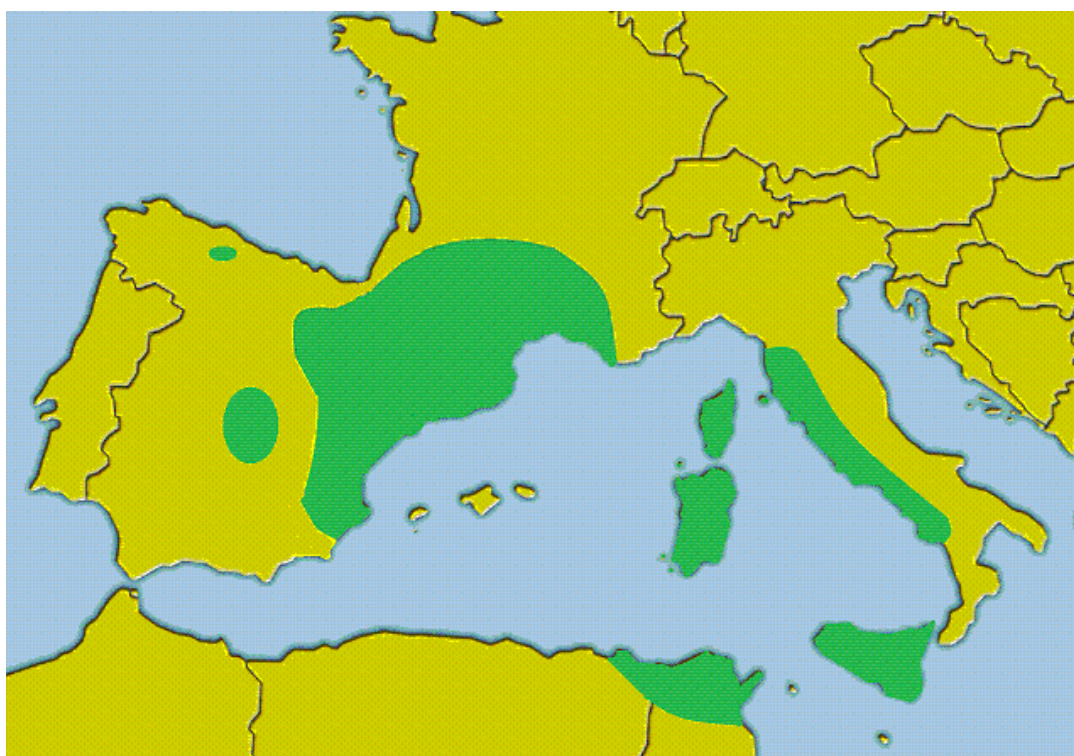
**Figura I.1.** Viñeta satírica “Man is but a worm”, publicada en la revista “Punch Magazine” el 6 de diciembre de 1881. La viñeta muestra como Darwin ha evolucionado desde el caos, a través de las lombrices de tierra, hasta un caballero respetable (Stürzenbaum *et al.* 2009).

A partir de ese momento hasta la actualidad han sido muchos los trabajos realizados sobre las lombrices de tierra, abarcando diferentes aspectos de su taxonomía, ecología y biología (Michaelson 1900, Stephenson 1930, Bouché 1972, Edwards y Lofty 1972, Lavelle 1983, Satchell 1983, Edwards y Bohlen 1996, Lavelle y Spain 2001, entre otros). El papel que las lombrices de tierra desempeñan es crucial para el funcionamiento del suelo, ya que contribuyen a modificar su estructura, intervienen de forma activa en los ciclos de los nutrientes y mezclan sus horizontes (Barley 1958, Lee 1985, Lavelle 1988, Parmelee *et al.* 1990, Zhang y Hendrix 1995, entre otros). Es por ello que son consideradas como Ingenieros del Ecosistema (Lavelle *et al.* 1997, Kooch y Jalilvand 2008). Además estos animales tienen influencia sobre determinados aspectos del crecimiento y desarrollo de la vegetación, al actuar indirectamente aumentando los nutrientes disponibles o modificando las comunidades microbianas en la rizosfera (Kreuzer *et al.* 2004), actuando como transportadores de semillas (Decaëns *et al.* 2003) e interviniendo en la composición de las comunidades de plantas e incluso en la competencia entre ellas (Scheu 2003, Kreuzer *et al.* 2004).

Se ha dedicado poco esfuerzo al conocimiento de los oligoquetos de la cuenca mediterránea, que son mucho menos conocidos que los de los países de la Europa húmeda, tanto en los aspectos taxonómicos, como en los faunísticos y biológicos en general. En este sentido, los estudios sobre reproducción y distribución de los Hormogastridae Michaelson, 1900 se limitan, casi exclusivamente, a los realizados en los últimos años por nuestro grupo de investigación sobre *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 en el centro de la Península (por ejemplo, Díaz Cosín *et al.* 1996, Valle *et al.* 1997, 1998, 1999, Garvín 1995, Garvín *et al.* 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, Ruiz 2003), así como a los trabajos de Omodeo (1956, 1998), Bouché (1970, 1972), Cobolli Sbordoni *et al.* (1992), Rota (1993) o Qiu y Bouché (1998).

## I.1. Lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae

La Familia Hormogastridae, está formada por cuatro géneros, 22 especies y ocho subespecies o variedades de lombrices de tierra, distribuidas por la Región Paleártica occidental (Omodeo 1998), casi exclusivamente en el área del Mediterráneo occidental: España, Francia, Italia, Países del Magreb y varias islas como Sicilia, Córcega, y Cerdeña (Díaz Cosín *et al.* 1989, Cobolli Sbordoni *et al.* 1992, Figura I.2).



**Figura I.2.** Área de distribución de la Familia Hormogastridae, que está limitada al Mediterráneo occidental. La mancha aislada en el centro de España corresponde a *Hormogaster elisae*, y la pequeña mancha en la Cordillera Cantábrica a *Xana omodeoi*.

Son lombrices de tamaño medio, grande o muy grande (*Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899, puede alcanzar 90 cm, Figura I.3). En España, los datos actualmente conocidos muestran que hay una zona muy rica en especies en Cataluña y Huesca, que se prolonga hacia el sur hasta la Vall d'Uixó en Castellón, y hacia el oeste por el Valle del Ebro hasta La Rioja y Navarra. Hay dos formas aisladas, *Xana omodeoi* Díaz Cosín *et al.* 1989, en Asturias y *H. elisae* en el centro peninsular. Dieciocho de las especies

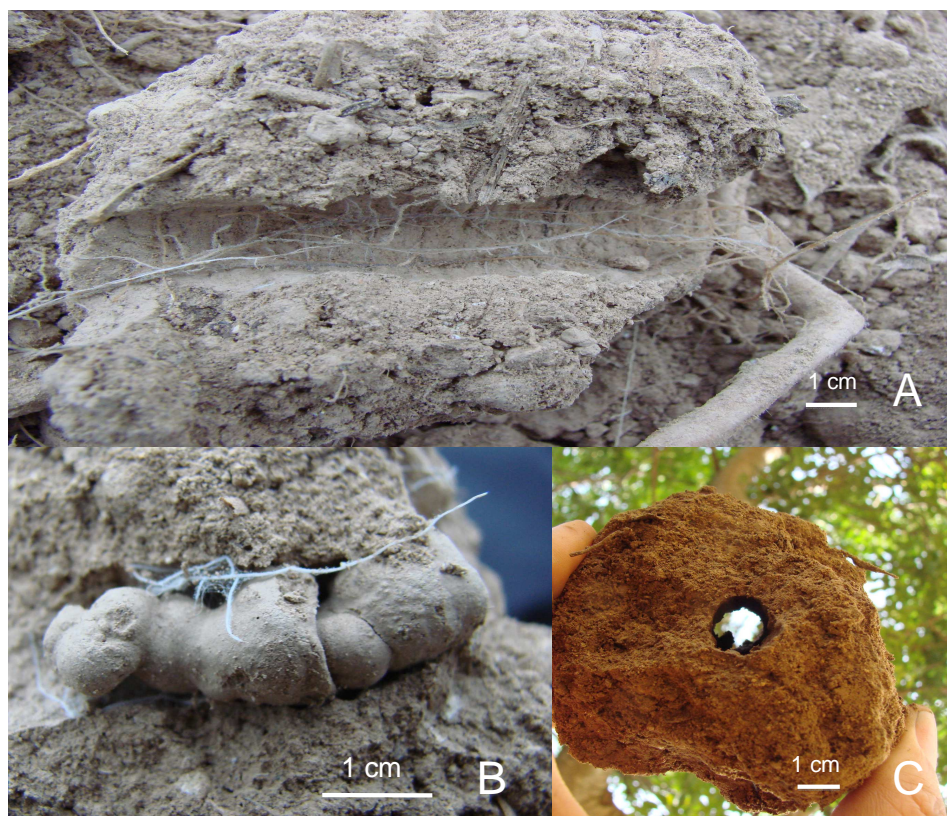
descritas pertenecen al género *Hormogaster*, de las cuales, 16 aparecen en la Península Ibérica que alberga la mayor diversidad y un número muy elevado de endemismos. A lo largo de muchos años de muestreo, Marcel Bouché, experto sistemático de lombrices sólo describió dos especies de hormogástridos en Francia (*Hemigastrodrilus monicae* y *Vignysa popi* Bouché, 1970) y en este mismo territorio, Emilia Rota describió otras dos (*Vignysa vedovinii* y *Hormogaster gallica* Rota, 1993), mientras que en un viaje de un par de semanas por el nordeste español, Bouché describió once especies (Qiu y Bouché 1998). Esto sugiere que España podría albergar una gran cantidad de endemismos por aflorar, ya que el territorio potencial de los hormogástridos no ha sido muestreado sistemáticamente. De hecho el propio Bouché (1972) así lo indica, diciendo que los Hormogastridae probablemente sólo se conocen de forma parcial. Por ello, es necesario el conocimiento más profundo de esta Familia y de sus endemismos para definir su distribución real, número de efectivos, evaluar su estado y proponer medidas de conservación.



**Figura 1.3.** Ejemplares de *Hormogaster pretiosa* (los más grandes) y *Hormogaster redii* en vivo (A) y tras ser fijados en alcohol de 96° (B), procedentes de Cerdeña.

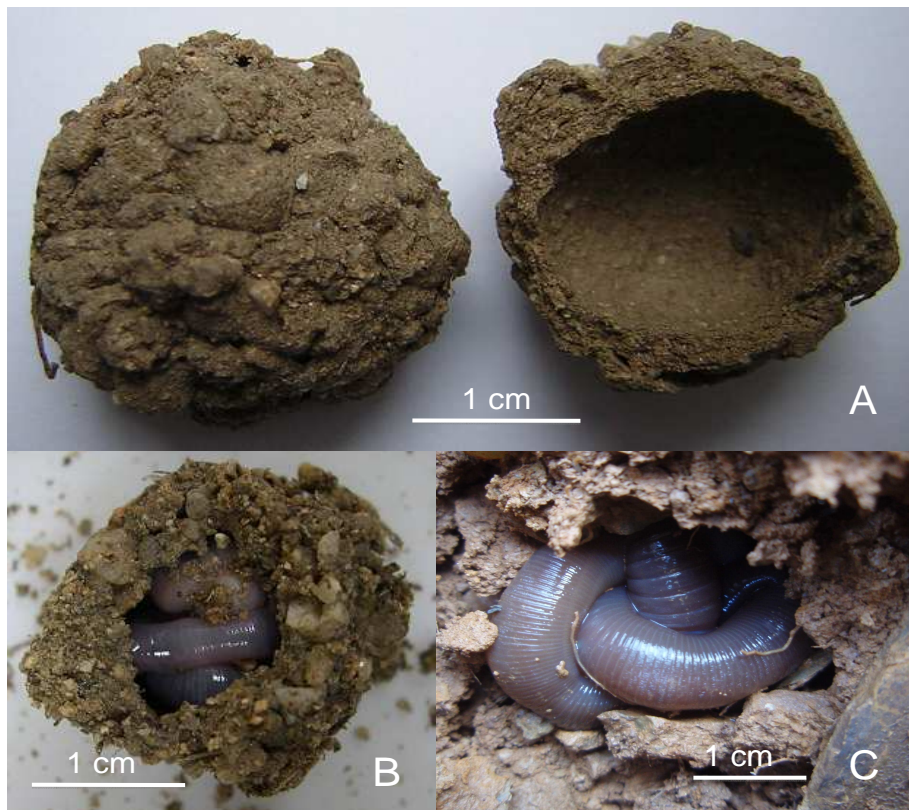


Debido a su gran tamaño, los hormogástridos tienen una importancia ecológica no despreciable en los ecosistemas de la cuenca Mediterránea occidental (Bouché 1972), trabajando el suelo e incrementando así la accesibilidad de nutrientes y aire para las plantas (Figura I.4). Los hormogástridos tienen una serie de adaptaciones que hace posible su supervivencia en los suelos más secos. Carecen de poros dorsales, evitando así pérdidas de agua y además son capaces de estivar cuando las condiciones no son favorables (Díaz Cosín 2006 y observación personal, Figura I.5). Pertenecen a la categoría ecológica de las endogeas, lo que dificulta bastante su muestreo, que se debe realizar manualmente, mediante excavación. En las épocas más secas es casi imposible su recolección, ya que migran a las capas más profundas del suelo, buscando la humedad. En muchas ocasiones, aunque la humedad sea suficiente, es necesario excavar profundamente para encontrarlas (Figura I.6).



**Figura I.4.** “Huella” de los hormogástridos en el interior del suelo Mediterráneo. A: Parte de una galería de *Hormogaster arenicola* en Biosca (Lérida). B: Heces de *H. arenicola* en Biosca (Lérida). C: Galería de *Hormogaster* en Cervera del Maestre (Castellón). Obsérvese cómo las raicillas siguen las galerías de las lombrices.





**Figura I.5.** Cámaras de estivación de *Hormogaster elisae* obtenidas en el laboratorio (A y B). *Hormogaster redii* estivando en el campo (C, Iglesias, Cerdeña).



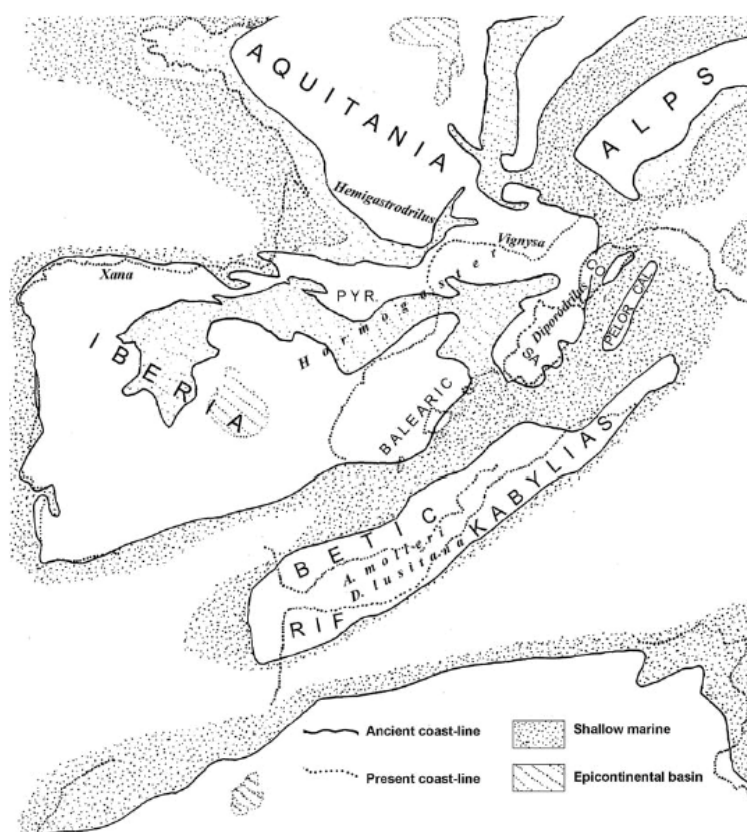
**Figura I.6.** Ejemplos de algunas de las zonas excavadas para muestrear hormogástridos, en los que se puede apreciar la profundidad a la que hay que llegar en ocasiones, y lo difícil que puede ser la captura de estas lombrices. En A, el suelo estaba muy seco y a pesar de haber galerías fue imposible encontrar especímenes. En B, un ejemplar de *Hormogaster pretiosa* se escapó por el punto que señala la flecha.

Se conoce muy poco sobre la filogenia interna de la Familia Hormogastridae, existiendo exclusivamente descripciones morfológicas de las distintas especies. A nivel molecular el conocimiento es prácticamente nulo y sólo hay un trabajo, cuya herramienta son las alozimas (Cobolli Sbordoni *et al.* 1992), en el que se analizan la especiación, divergencia genética y paleogeografía de especies de distintos géneros de esta Familia.

La posición filogenética de los Hormogastridae dentro de las lombrices de tierra no está muy clara y ha sido discutida por diferentes autores. Bouché (1972) consideraba a los hormogástridos como un vínculo filogenético entre los Glossoscolecidae-Microchaetidae y los Lumbricidae-Diporodrilidae. La afinidad de los Hormogastridae y los Microchaetidae ya había sido discutida por algunos autores (Stephenson 1930, Omodeo 1956). Los análisis moleculares realizados por Jamieson *et al.* (2002) indicaron que los hormogástridos se encontraban en un clado diferente a los glososcolécidos, en los que se les había incluido como una Subfamilia (Jamieson 1971). Además, se revelaron relaciones, aunque no resueltas, con Sparganophilidae, Komarekionidae, Almidae (*Criodrilus*), Lutodrilidae y Lumbricidae utilizando técnicas de biología molecular. Los hormogástridos fueron considerados como el taxón hermano de Lumbricidae por Rota y Omodeo (1992) y Omodeo (2000).

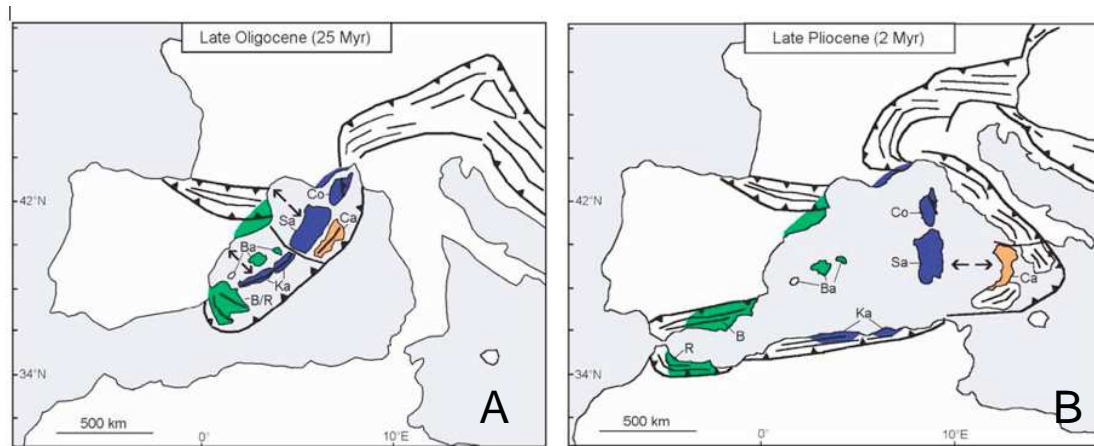
Bouché (1972) propuso que los hormogástridos ya estaban presentes en la Placa Ibérica en el Cretácico tardío, ocupando tierras que coincidirían a grosso modo con su área de distribución actual. La cuenca Mediterránea es un lugar con un nivel excepcional de biodiversidad (Blondel y Aronson 1999, Myers *et al.* 2000), probablemente debido entre otras cosas a una historia geológica muy dinámica. En el comienzo del Oligoceno (33 millones de años aproximadamente), varias microplacas continentales, incluyendo la actual Cerdeña, Córcega, las Islas Baleares, Calabria, las Kabalias y la Cordillera Bético-Rifeña (donde no se han encontrado hormogástridos hasta el momento), se desgajaron del nordeste de la Península Ibérica y comenzaron a dirigirse a su ubicación actual (Schettino y Turco 2006). Durante la primera fase, el conjunto de microplacas del norte (Cerdeña, Córcega y Calabria) comenzaron a moverse en sentido contrario al de las agujas del reloj con respecto a la placa Euroasiática (Rosenbaum *et al.* 2002). Tras separarse del Continente, el bloque Sardo-Corso se fragmentó de una forma que aún no está clara. La fecha de separación entre

estas islas está datada entre 20-16 millones de años (Rosenbaum *et al.* 2002) y 9 millones de años (Álvarez 1972, 1974) y parece que durante mucho tiempo la esquina suroccidental de la isla de Cerdeña estuvo separada del grueso de la isla por un brazo de mar, que se rellenaría posteriormente con depósitos aluviales de la llanura de Campidano (Omodeo y Rota 2008). En el Mioceno, el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico quedaron desconectados, lo que provocó un descenso en el nivel de agua hace unos 5-6 millones de años (Blondel y Aronson 1999, Krijgsman *et al.* 1999) que implicó la emergencia de conexiones de tierra y presumiblemente intercambios faunísticos. Estos intercambios también se produjeron durante los ciclos glaciares del Pleistoceno en los que la regresión del nivel del mar provocó conexiones posteriores entre las islas y otras tierras continentales del Mediterráneo. En la Figura I.7 se muestra una representación de lo que podía ser la distribución de los hormogástridos a finales del Eoceno según Omodeo y Rota (2008) y en la Figura I.8 se muestran reconstrucciones paleogeográficas del Mediterráneo en las que se visualiza cómo fue el movimiento de las microplacas.



**Figura I.7.** Mapa paleogeográfico del Mediterráneo occidental en el Eoceno tardío (36 millones de años). Tomado de Omodeo y Rota (2008) y a su vez modificado de Andeweg (2002). El sistema Bético-Rifeño, incluyendo las Kabilias, está despegado de Iberia, mientras que el sistema Sardo-Corso está conectado a los Pirineos y algo más al norte está conectado al sur de Francia. CAL: Calabria, CO: Córcega, PELOR: Macizo Peloritani, PYR: Pirineos, SA: Cerdeña.





**Figura 1.8.** Reconstrucciones de la paleogeografía del Mediterráneo occidental en el Oligoceno tardío (A) y el Plioceno tardío (B), tomadas de Magri *et al.* (2007). Los colores se corresponden con los haplotipos de *Quercus suber* encontrados en ese estudio. R: Rif, B: Cordillera Bética, Ba: Islas Baleares, Ka: Kabiliyas, Co: Córcega, Sa: Cerdeña, Ca: Calabria.

Como se ha comentado, la Familia Hormogastridae fue establecida por Michaelsen 1900 y posteriormente Bouché elaboró una diagnosis más completa (Bouché 1970, 1972). Las lombrices de tierra de esta Familia se caracterizan por:

- Ausencia de poros dorsales
- Quetas genitales acanaladas
- Clitelo que comienza por la zona de los poros masculinos
- Posición de los poros masculinos en la zona clitelar variando de  $\frac{1}{2}$  15 a 15/16.
- Poros femeninos situados entre  $\frac{1}{2}$  14 y 14/15 en las áreas entre las quetas *ab* o *cd*.
- Poros de las espermatecas simples o múltiples al nivel de los segmentos genitales.
- Holonefridios.
- Poros nefridianos bien visibles, cuya primera desembocadura se encuentra detrás de la hendidura 2/3.
- Mollejas anteriores bien desarrolladas, siempre presentes.
- Molleja posterior generalmente rudimentaria o ausente.
- Cápsulas seminales ausentes
- Dos pares de vesículas seminales en 11 y 12
- Próstatas ausentes
- Holándrico y metagino
- Tiflosol con láminas longitudinales

La Familia consta de tres Subfamilias:

-La Subfamilia Hormogastrinae Bouché, 1970 (con tres mollejas en los segmentos 6, 7 y 8. Sin vesículas sanguíneas) incluye los géneros *Hormogaster* Rosa, 1887 (con los poros femeninos situados en el área entre las quetas *b* y *c*, con molleja posterior rudimentaria, en general sin glándula de Morren) y *Hemigastrodrilus* Bouché, 1970 (con los poros femeninos situados en el área ventral entre las quetas *a* y *a*, sin molleja posterior rudimentaria, con glándula de Morren).

-La Subfamilia Vignysinae Bouché, 1970 (con dos mollejas desiguales en 6 y 6/7, tiflosol con 2-5 láminas) incluye el género *Vignysa* Bouché, 1970.

-La Subfamilia Xaninae Díaz Cosín *et al.*, 1989 (con dos mollejas desiguales en 6 y 6/7, tiflosol que llega a tener 12 láminas) incluye el género *Xana* Díaz Cosín *et al.*, 1989.

En la Tabla I.1 se muestran todas las especies, subespecies y variedades descritas hasta el momento, indicando el autor y la localidad tipo.

Género	Especie (subespecie o variedad)	Autor	Año	Localidad tipo
<b>Hormogaster</b>	<u><i>H. redii redii</i></u>	Rosa	1887	Ghilarza (Oristano, Cerdeña, Italia)
	( <i>H. r. gigantea</i> )	Michaelsen	1918	Cerdeña (Italia)
	( <i>H. r. insularis</i> )	Bouché	1970	Volpajola (Haute-Corse, Corsica, Francia)
	<i>H. pretiosa pretiosa</i>	Michaelsen	1899	Cagliari (Cerdeña, Italia)
	( <i>H. p. hispanica</i> )	Michaelsen	1925	Flix (Tarragona, España)
	( <i>H. p. nigra</i> var.)	Bouché	1970	Quillan (Aude, Francia)
	( <i>H. p. arrufati</i> )	Álvarez	1977	Vall d'Uixó (Castellón, España)
	Otras variedades	Michaelsen	1925	Provincias de Lérida y Barcelona *
	<i>H. samnitica samnitica</i>	Cognetti	1914	Monte Greco (Abruzzo, Italia)
	( <i>H. s. lirapora</i> )	Bouché	1970	Col de la Testa (Corse-du-Sud, Corsica, Francia)
	( <i>H. s. l. magna</i> var.)	Bouché	1970	Sainte-Lucie-de-Tallano (Corse-du-Sud, Corsica, Francia)
	<i>H. pretiosiformis</i>	Zicsi	1970	Puerto de Monrepós (Huesca, España)
	<i>H. oroeli</i>	Álvarez	1971	Peña Oroel (Huesca, España)
	<i>H. elisae</i>	Álvarez	1977	Siguero (Segovia, España)
	<i>H. gallica</i>	Rota	1993	Banyuls-sur-Mer (Pyrénées-Orientales, Francia)
	<i>H. riojana</i>	Qiu y Bouché	1998	Alesanco (La Rioja, España)
	<i>H. ireguana</i>	Qiu y Bouché	1998	Torrecilla en Cameros (La Rioja, España)
	<i>H. eserana</i>	Qiu y Bouché	1998	Graus (Huesca, España)
	<i>H. huescana</i>	Qiu y Bouché	1998	Loporzano (Huesca, España)
	<i>H. lleidana</i>	Qiu y Bouché	1998	Talarn (Lérida, España)
	<i>H. multilamella</i>	Qiu y Bouché	1998	Etxauri (Navarra, España)
	<i>H. arenicola</i>	Qiu y Bouché	1998	Biosca (Lérida, España)
	<i>H. catalaunensis</i>	Qiu y Bouché	1998	El Brull (Barcelona, España)
	<i>H. sysvestris</i>	Qiu y Bouché	1998	Montmajor (Barcelona, España)
	<i>H. najaformis</i>	Qiu y Bouché	1998	Ordal y Monistrol de Montserrat (Barcelona, España)
	<i>H. castillana</i>	Qiu y Bouché	1998	Morella y Vallivana (Castellón, España)
	<i>H. abbatissae</i>	Esta memoria	2010	Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España)
<b>Hemigastrodrilus</b>	<u><i>He. monicae</i></u>	Bouché	1970	Laubert (Lozère, Francia)
	( <i>He. m. magnus</i> var.)	Bouché	1970	Cardayre (Lot-et-Garonne, Francia)
<b>Vignysa</b>	<u><i>V. popi</i></u>	Bouché	1970	Saint-Gely-du-Fesc (Hérault, Francia)
	<i>V. vedovinii</i>	Rota	1993	Pignans (Var, Francia)
<b>Xana</b>	<u><i>X. omodeoi</i></u>	Díaz Cosín <i>et al.</i>	1989	San Román (Asturias, España)

**Tabla I.1.** Lista de géneros, especies, subespecies y variedades descritas en los Hormogastridae, indicando el autor y año de descripción y la localidad tipo. La especie tipo de cada género se muestra subrayada. \* Michaelsen encontró individuos en otras localidades, donde sugirió la posibilidad de nuevas subespecies, pero que no describió por la mala conservación del material que poseía. Estas localidades fueron Montsec (Lérida), entre Peralba y Figuerola de Meya (1 individuo) y entre Pont de Raventí y Guardiola (Barcelona, 3 individuos).

## I.2. El caso concreto de *Hormogaster elisae*

*H. elisae* (Figuras IV.1 y IV.3) es endémica del área central de la Península Ibérica, y es la única especie de hormogástrido que se ha encontrado en esta región. Fue descrita por Álvarez en 1977 a partir de ejemplares recogidos en Siguero (Segovia) y posteriormente se ha encontrado en otras localidades de Segovia y Madrid como El Pardo (Moreno 1981), El Molar (Garvín 1995), Redueña (Garvín *et al.* 2002), Anchuelo, Aranjuez, La Cabrera, Loyozuela, Navas de Buitrago, Paracuellos del Jarama, Sevilla la Nueva y Venturada (Jesús *et al.* 2002).

Atendiendo a los criterios de clasificación ecológica de Bouché (1971, 1972) y Lavelle (1979 y 1981) se podría caracterizar como una lombriz de tierra endogea, geófaga y oligohúmica. Sin embargo, se ha observado que realiza desplazamientos verticales a lo largo del año en función de la humedad del suelo (Valle *et al.* 1999), pudiéndose encontrar a pocos centímetros de la superficie en los periodos de mayor humedad edáfica, por lo que podría utilizar diferentes recursos en distintos momentos del año.

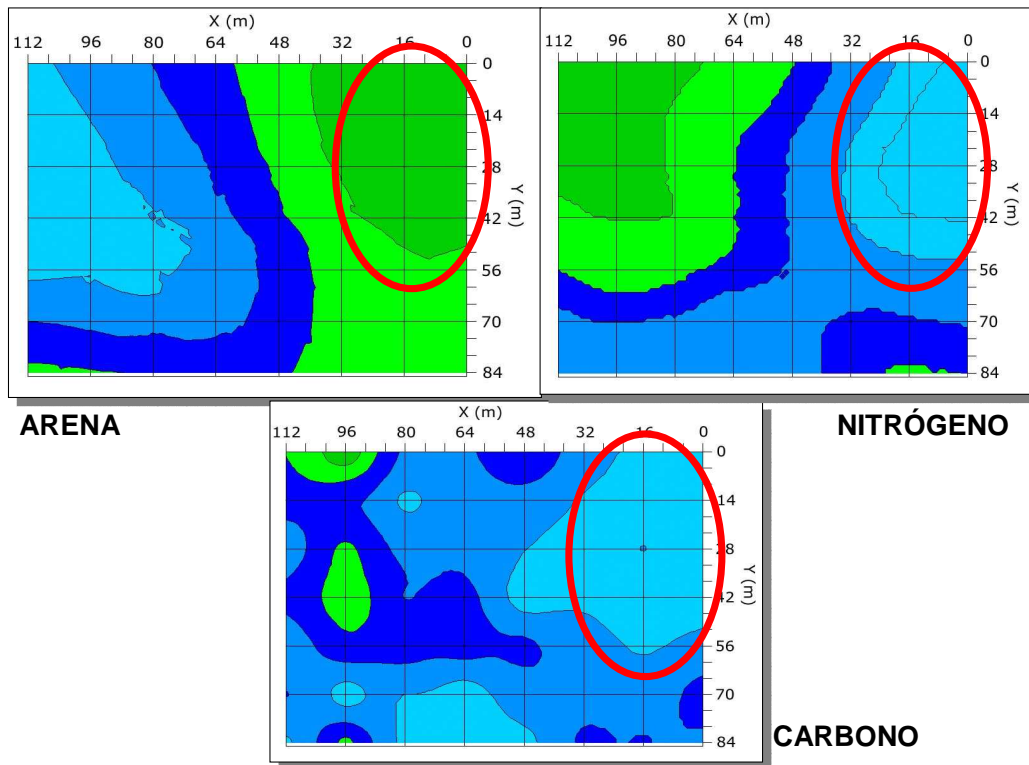
Esta especie puede ser muy abundante en suelos arenosos y pobres en materia orgánica, que están sometidos a fuerte erosión y aridez estival, y que en principio no son adecuados para cubrir los requerimientos de otras especies de lombrices de tierra. Hernández *et al.* (2007) observaron en una parcela de El Molar (Madrid) que *H. elisae* ocupaba las zonas con mayor contenido en arenas totales y menor contenido en nitrógeno y carbono (Figura I.9). Quizás este ambiente adverso pueda explicar el hecho de que *H. elisae* aparezca en ocasiones formando poblaciones monoespecíficas en los suelos más pobres o coexista con otras especies de lombrices de tierra en los suelos más enriquecidos (Hernández 2005). Cuando las condiciones ambientales son poco favorables, sobre todo por la falta de lluvias y sequedad del suelo, puede entrar en paradiapausa (Ruiz 2003, Díaz Cosín *et al.* 2006) y mantenerse en cámaras de estivación hasta que las condiciones vuelven a ser adecuadas (Figuras I.5.A y B).

El Cambio Climático presumiblemente favorecerá la expansión de este tipo de suelos, incrementando de esta forma la importancia ecológica de las lombrices de la

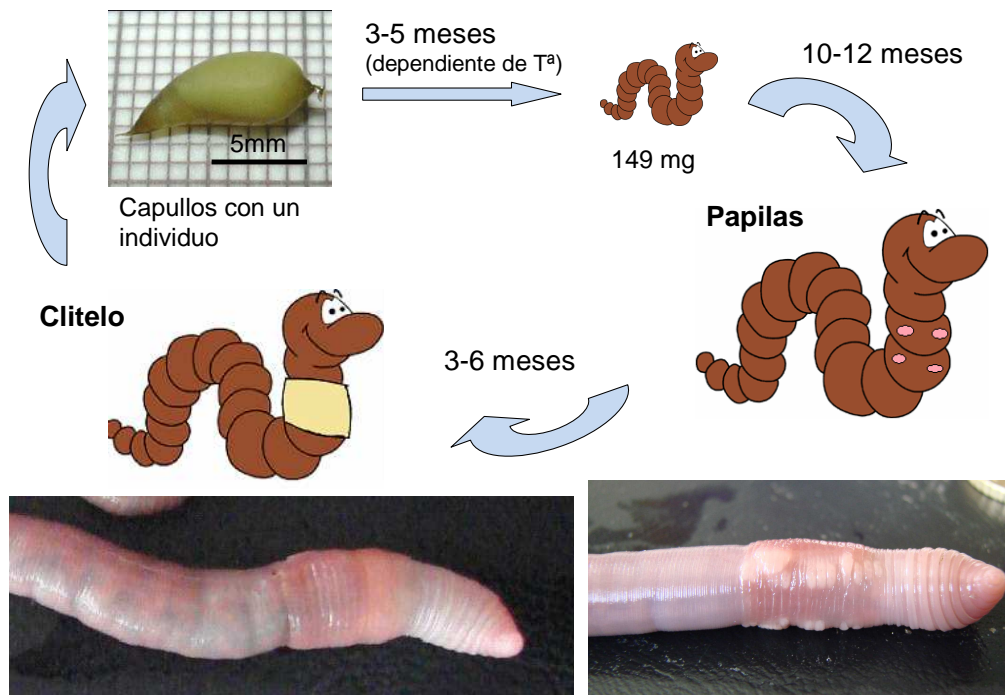
Familia Hormogastridae y particularmente de *H. elisae*. Es por ello que sería de gran valor una información más detallada sobre la distribución de las especies, diversidad genética y estructuración de las poblaciones de esta Familia.

El ciclo biológico de *H. elisae* es relativamente largo comparado con el de otras lombrices de tierra y se ha sugerido que presenta una estrategia reproductiva del tipo K (Valle *et al.* 1997). Díaz Cosín *et al.* (2009) observaron que un “individuo medio” de *H. elisae* pesa al nacer 149 mg, sus papilas genitales aparecen a los 356 días de edad, y el clitelo a los 484 días, se reproduce durante 2 ó 3 años como promedio, y produce entre 0,9 y 2,22 capullos lombriz<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>. Sin embargo esta tasa de producción fue calculada en condiciones experimentales, y aumentaba con un enriquecimiento de los microcosmos con materia orgánica (Hernández 2005). La eclosión y el desarrollo de papilas genitales se producen a lo largo del año, y el clitelo se forma preferentemente entre octubre y marzo (Díaz Cosín *et al.* 2009). Las gametogénesis masculina y femenina están sincronizadas, comenzando en otoño y parando en verano. Los embudos seminales están llenos de espermatozoides y las espermatecas contienen espermatozoides a lo largo de todo el año, aunque se observan dos picos de reproducción, siendo el mayor en la primavera y el segundo en otoño (Garvín *et al.* 2003). En la Figura I.10 se representa el ciclo biológico de esta especie teniendo en cuenta los resultados de estos estudios y nuestras observaciones personales.

Además de los citados, se han realizado diversos estudios sobre esta especie, centrados en su reproducción (Garvín *et al.* 1999), alimentación (Garvín *et al.* 2000, Ruiz *et al.* 2006), crecimiento (Valle *et al.* 1998), efecto sobre el suelo (Garvín *et al.* 2001) y sobre su relación con otros organismos con los que comparte hábitat, como otras lombrices de tierra (Garvín *et al.* 2002, Ramajo 2010) o microartrópodos (Gutiérrez *et al.* 2003, 2006, 2008). Sin embargo, muchos de los aspectos de la biología y ecología de *H. elisae* son aún desconocidos y, por ello, es necesario proseguir las investigaciones para seguir aumentando nuestro conocimiento sobre esta especie.



**Figura I.9.** Mapas de la distribución espacial en una parcela de El Molar (Madrid) del contenido en arenas totales, nitrógeno y carbono, obtenidos mediante técnicas de geoestadística (Hernández *et al.* 2007). El color azul claro representa los valores mínimos y el verde oscuro los máximos. Se representa rodeada la zona en la que se encuentra *Hormogaster elisae*.



**Figura I.10.** Representación del ciclo de *Hormogaster elisae* estudiado en el laboratorio. Véase Hernández (2005) para más detalles.

### **I.3. Selección sexual en lombrices de tierra hermafroditas de fecundación cruzada**

Los modelos de reproducción en lombrices de tierra son más variables de lo que podría pensarse *a priori*. Aunque el hermafroditismo simultáneo de fecundación cruzada (con inseminación recíproca, y transferencia y recepción de espermatozoides en la misma cópula) parece ser el modelo más extendido, siendo el que siguen los hormogástridos, es común encontrar otras estrategias, como auto-fecundación o partenogénesis.

Hasta hace muy poco tiempo nuestros conocimientos sobre la biología reproductiva de las lombrices de tierra se basaban en trabajos clásicos, pero excelentemente realizados, como los de Grove (1925) y André (1963) los cuales reflejaban el estado e intereses de la ciencia en ese momento. Durante los últimos años, se ha hecho un gran esfuerzo para entender algunos de los aspectos de la selección sexual en lombrices de tierra, como la evaluación de pareja, comportamiento de cópula y competencia espermática (véanse ejemplos más adelante). Sin embargo, aún queda mucho por descubrir y será necesario continuar las investigaciones para entender mejor la biología reproductiva de estos animales. El capítulo III de esta memoria está dedicado a responder algunas preguntas sobre la selección de pareja en *H. elisae*.

En hermafroditas simultáneos es esperable un compromiso entre las funciones sexuales masculina y femenina, ya que ambos sexos comparten recursos limitados procedentes de un mismo individuo. Además, la estrategia para maximizar la eficacia biológica es diferente para las funciones masculina y femenina. Este hecho ya fue explicado por Bateman (1948), que mostró que cuanto mayor fuera el número de parejas con las que se copulaba, mayor sería la eficacia biológica para la función masculina, ya que ésta produce células de espermatozoides pequeñas. Sin embargo, la función femenina maximiza su eficacia biológica buscando parejas de buena calidad debido a que produce gametos grandes y esta función debe invertir en producción de capullos. Como consecuencia, hay un conflicto entre sexos. De hecho, Porto *et al.* (2008), estudiando ejemplares de *Eisenia andrei*, encontraron una relación negativa entre la inversión actual en la función masculina y la fertilidad futura de la función femenina. Es

predecible que exista selección sexual por causa de la función femenina, siempre y cuando haya disponible un buen número de parejas potenciales.

### **I.3.1. Selección sexual previa a la cópula**

La unión durante la cópula, que puede durar entre 69 y 200 minutos en *Lumbricus terrestris* (Nuutinen y Butt 1997), se asegura por medio de los tubérculos pubertarios y las quetas. Las lombrices epigeas y anécicas pueden copular en la superficie, lo que aumenta el riesgo de depredación, mientras que las lombrices endogeas lo hacen en las capas más profundas del suelo. La cópula supone un gran gasto de energía e implica producción de mucus y esperma y largos periodos de tiempo. Como consecuencia, la selección sexual previa a la cópula es predecible en aquellos ambientes en los que la densidad de lombrices de tierra es alta.

Uno de los factores que podría influir en la selección sexual previa a la cópula es la fecundidad femenina de la pareja potencial, que podría estar relacionada con el tamaño corporal. No se ha probado que las lombrices de tierra grandes produzcan más capullos (Butt y Nuutinen 1998, Tato *et al.* 2006), pero sí se ha visto que tienen una tendencia a producir capullos más pesados y una descendencia mayor (Michiels *et al.* 2001). Se ha observado en efecto, apareamiento dependiente del tamaño corporal en el campo en la lombriz de tierra epigea *Eisenia fetida* (Monroy *et al.* 2005) y también en experimentos de laboratorio llevados a cabo con la lombriz de tierra anécica *L. terrestris* (Michiels *et al.* 2001). Ambos autores observaron que las lombrices seleccionaban compañeros de cópula de tamaño similar. El hecho de que todos los individuos busquen un compañero de mayor tamaño, conduce a un equilibrio que resulta en parejas compuestas por individuos de tamaño similar, lo que equilibra las expectativas de ambos en cuanto a las funciones masculina y femenina. En el caso particular de lombrices epigeas y anécicas, que pueden copular en la superficie, esta tendencia general podría ser reforzada por un compromiso: las lombrices pueden seleccionar un compañero de cópula de mayor tamaño y por lo tanto más fértil, o un compañero de cópula de menor tamaño, que disminuiría el riesgo de depredación.

Además del tamaño, otra característica que se evalúa al seleccionar pareja es la reciprocidad. En hermafroditas simultáneos el propósito principal del apareamiento es la



fecundación de los óvulos de su pareja, más que la fecundación de sus propios óvulos. Así, cuando dos lombrices están copulando existe un conflicto en cuanto a la cantidad de espermatozoides que se le permite donar a cada una de ellas (Michiels 1998).

Finalmente, otros factores para la evaluación previa a la cópula podrían ser la calidad del lugar donde se depositarán los capullos tras la cópula y la adecuación de la galería para el desarrollo de la prole, por ejemplo la cantidad de humedad o contenido de hojarasca. Ortiz-Ceballos y Fragoso (2006) estudiaron el cuidado parental en *Pontoscolex corethrurus* y *Balanteodrilus pearsei*. Observaron que ambas especies construían una cámara que periódicamente limpiaban y rodeaban con heces frescas, donde depositaban un único capullo. Grigoropoulou *et al.* (2008) observaron que *L. terrestris* depositaba los capullos en galerías secundarias, que podrían ofrecer un lugar seguro frente al ambiente físico o podrían representar una forma de inversión parental, ya que se encontraban cubiertas con heces de lombriz. Estas heces podrían representar una forma de mantener la humedad o de proteger los capullos frente a los depredadores.

Todavía no se conoce con certeza el mecanismo por el que las lombrices eligen un compañero y evalúan su tamaño, reciprocidad o calidad de sus galerías, pero sí que existen estudios sobre este tema. Se han indicado las señales químicas como mecanismo para encontrar y atraer al compañero (Olive y Clark 1978, Edwards y Bohlen 1996). Grove y Cowley (1926) sugirieron la existencia de un comportamiento de cortejo en *E. fetida*, ya que observaron contactos cortos y repetidos entre compañeros en los momentos previos a la cópula. Este tipo de contacto, que realizan con el prostomio, fue observado también por Nuutinen y Butt (1997) en *L. terrestris* y puede durar hasta 90 minutos. El prostomio se ha descrito como un lóbulo sensorial con gran cantidad de receptores químicos o células sensoriales (Wallwork 1983). Durante el contacto, el clitelo y las estructuras asociadas a éste podrían ser indicadores de la función femenina y los labios de los poros masculinos podrían serlo de la función masculina. Estas estructuras proporcionan una forma de evaluar al compañero y asegurar así, la reciprocidad. Ésta, puede asegurarse también incrementando el tiempo de duración de la cópula, lo que evitaría además que el compañero copulara con otras lombrices diferentes. Además, Nuutinen y Butt (1997) observaron que *L. terrestris* visitaba la galería de la pareja potencial, como mecanismo para evaluar su calidad. Durante estas

visitas, la lombriz insertaba los segmentos anteriores pero mantenía la parte posterior del cuerpo en su propia galería.

En el caso de evaluación de tamaño, también se ha sugerido que el hecho de que las lombrices copulen con individuos de talla similar se debe simplemente a una incompatibilidad física durante el acoplamiento para la cópula, que se daría si las lombrices son de diferente tamaño (Michiels *et al.* 2001). Sin embargo, esta incompatibilidad solo sería resultado de diferencias de talla exageradas y no ha sido demostrada.

Estas fuerzas selectivas que se han nombrado, dependen además de otros factores, como la densidad de lombrices de tierra o la distancia entre parejas potenciales. De hecho, la escasa capacidad de dispersión de estos animales impone una restricción en el número de parejas disponibles. Las lombrices de tierra tienen tasas de migración muy bajas, y se ha observado que las tasas naturales de dispersión están en el rango de 1,4-9 m/año (Ligthart y Peek 1997, Hale *et al.* 2005). Por ello, se espera que la cópula se produzca entre lombrices que habitan en las cercanías. Además, en el caso de las lombrices que copulan en la superficie, una menor distancia respecto al compañero de cópula minimizaría el riesgo de depredación. Hay algunas pruebas de esta limitación selectiva que produce la distancia. Nuutinen y Butt (1997) estudiaron los patrones de visitas de *L. terrestris* y descubrieron que cuanto más cerca estuviera la apertura de la galería, más visitas hacían estas lombrices para evaluar la calidad de la pareja potencial. Además, Sahm *et al.* (2009) demostraron selección de la pareja más próxima en la misma especie.

No obstante, esta escasa capacidad de dispersión podría causar endogamia, que está aceptada como inadaptativa y que reduciría la eficacia biológica de la descendencia. No se ha demostrado que la selección de pareja sea dependiente del grado de parentesco y, a este respecto, se intuye que podría existir una inversión diferencial en la prole (Velando *et al.* 2006, véase más adelante).

Por último, la concentración de parásitos podría influir en la selección de pareja, ya que éstos tienen un efecto negativo en el crecimiento de la lombriz, como han mostrado Field y Michiels (2005) estudiando la asociación entre *Monocystis* y *L.*

*terrestris*. Además, el color del tegumento de la lombriz podría estar relacionado positivamente con la concentración de parásitos (Field *et al.* 2003), lo que podría ser un indicio usado para evaluar a las parejas. Sin embargo, Sahm *et al.* (2009) no pudieron demostrar que existiera una relación entre la concentración de parásitos (*Monocystis*) y la selección de pareja en *L. terrestris* y se necesitan más estudios para evaluar esta posible correlación.

### **I.3.2. Selección sexual posterior a la cópula**

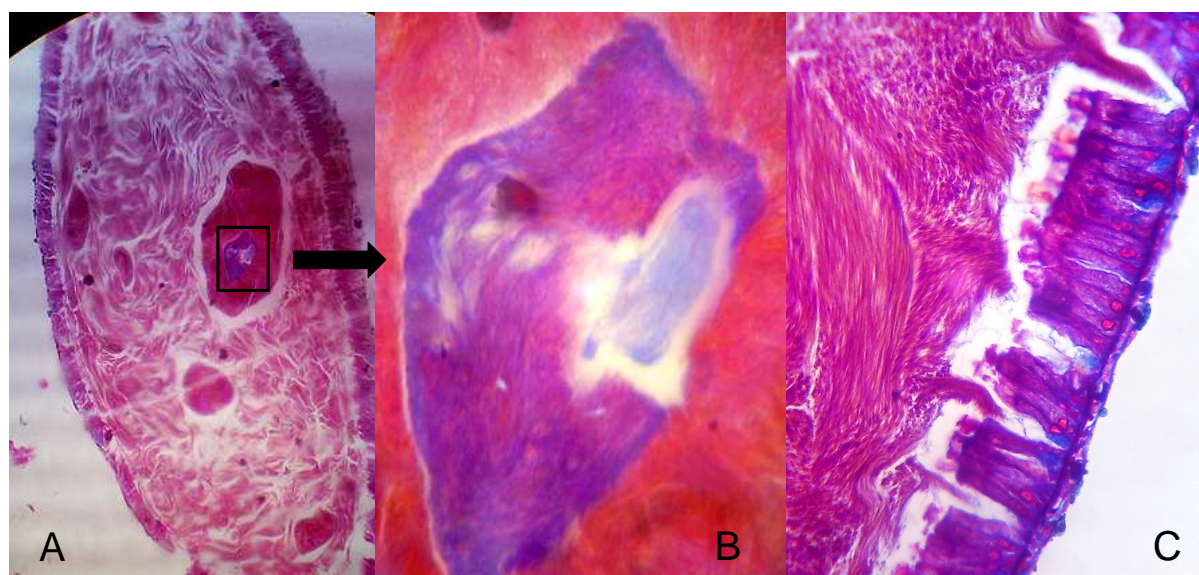
A pesar de la existencia de selección sexual previa a la cópula, el apareamiento múltiple es común en lombrices (Monroy *et al.* 2003, Sahm *et al.* 2009). Por ello, se puede esperar que haya selección sexual posterior a la cópula, como puede ser la competencia espermática (Parker 1970) o la selección críptica femenina (“cryptic female choice”, Thornhill 1983). El espermatozoides recibido es almacenado en las espermatecas, donde se mantiene viable hasta que se produce la fecundación. Butt y Nuutinen (1998) observaron este mantenimiento en las espermatecas de *L. terrestris* durante seis meses. Meyer y Bowman (1994) observaron que *E. fetida* continuaba produciendo capullos durante doce meses después de la separación de su pareja y su aislamiento, aunque estos autores no midieron la viabilidad de los capullos. Garvin *et al.* (2003) encontraron espermatecas llenas de espermatozoides incluso durante la diapausa en *H. elisae*. Esto podría ser ventajoso para especies con escasa capacidad de dispersión o que se encuentran a bajas densidades y pueden copular en cualquier momento del año.

El mantenimiento del espermatozoides durante tanto tiempo implica la existencia de algún tipo de mecanismo para su conservación. Hay pruebas que sugieren que el epitelio de la espermateca contribuye activamente al mantenimiento exitoso del espermatozoides proporcionando un ambiente luminal favorable (Grove 1925, Varuta y More 1972) o mediante la producción de sustancias nutritivas (Vyas y Dev 1972, Jamieson 1992). Un posible mecanismo de selección sexual posterior a la cópula desarrollado por el receptor de espermatozoides, es la digestión del mismo. Richards y Fleming (1982) observaron fagocitosis de espermatozoides en la espermateca de la lombriz partenogenética facultativa *Dendrobaena subrubicunda* y en otros lumbricidos. Esto está probablemente relacionado con la eliminación de espermatozoides aberrante o antiguo durante los meses en los que la producción de capullos es mínima.

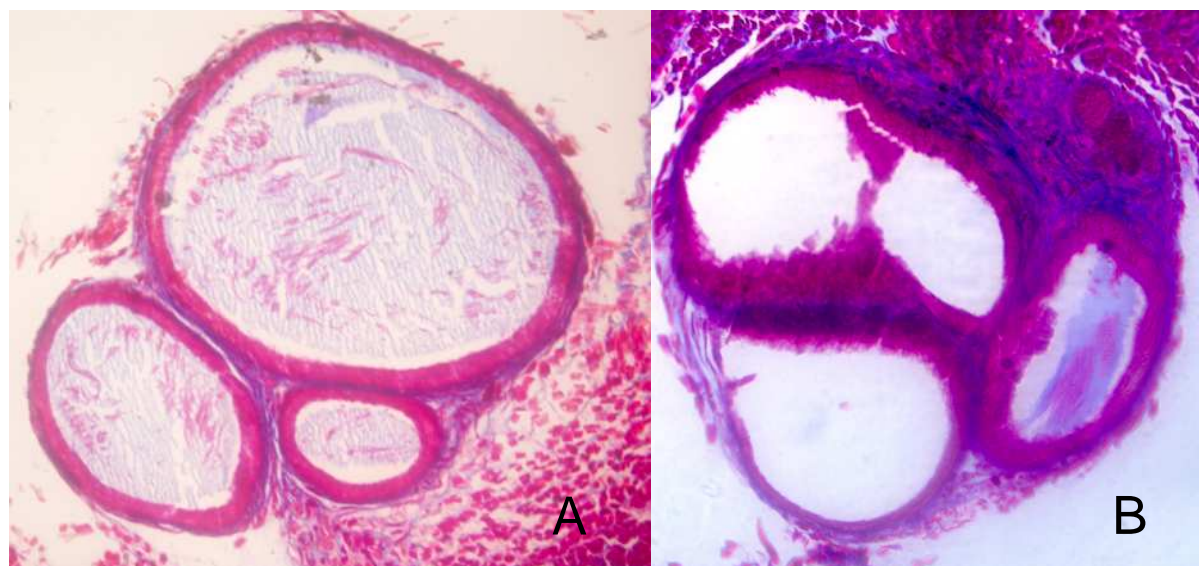
En un estudio histológico que está llevando a cabo nuestro grupo en este momento (sin publicar), se observaron imágenes que se podrían interpretar como degeneración de esperma en el área central de las espermatecas de *H. elisae* (Figuras I.11.A y B). También se observaron intrusiones de esperma en el epitelio de aquellas espermatecas que presentaban alto contenido en esperma, aunque estas intrusiones parecían encontrarse en áreas donde el esperma “buscaba” más nutrientes, y no parecían estar relacionadas con procesos de fagocitosis (Figura I.11.C). Futuros estudios de ultraestructura desvelaran la naturaleza de estos mecanismos.

Otra estrategia de selección femenina críptica sería el almacenamiento diferencial del esperma recibido en diferentes espermatecas. El receptor podría controlar este almacenamiento mediante el aumento en la complejidad de estos órganos. Distintas especies de lombrices de tierra presentan distinto número de espermatecas (Sims y Gerard 1999). Además, algunas lombrices de tierra presentan diferentes cargas de esperma en una misma espermateca. Esto se ha observado por ejemplo en algunos hormogástridos (Qiu y Bouché 1998, Figura I.12), y en *Megascolides australis*, en el que Van Praagh (1995) observó spermatzeugmata (es decir, esperma dispuesto en paquetes orientados). Además las espermatecas pueden incluir uno o más divertículos que surgen del conducto principal (Butt y Nuutinen 1998).

Grove y Cowley (1926) observaron que la transmisión de esperma en *E. fetida* normalmente se da en ambos lados del individuo, mientras en *L. terrestris* se han visto algunos ejemplares con espermatóforos en sólo uno de los lados de su cuerpo (Butt y Nuutinen 1998). Bouché (1975) indicó que se habían observado espermatóforos en más de 20 especies de lumbrícidos. Su función no está clara y se ha sugerido que podrían tener un papel en la transferencia de esperma (Edwards y Bohlen 1996), evitando así la digestión de éste en la espermateca y fertilizando los óvulos durante la formación del capullo (Michiels 1998). Sin embargo, no se ha podido demostrar que los espermatóforos tengan algún efecto en el éxito reproductivo (Monroy *et al.* 2003).



**Figura I.11.** Preparaciones histológicas teñidas mediante la técnica de Mallory de la espermateca de *Hormogaster elisae*. Posible degeneración del esperma (A y B). Instrusiones del esperma en el epitelio de la espermateca (C).



**Figura I.12.** Preparaciones histológicas teñidas mediante la técnica de Mallory de la espermateca de *Hormogaster riojana* en las que se observan las diferentes cámaras o lóbulos, separados por tejido que poseen en las espermatecas. Espermateca con tres cámaras (A). Espermateca con cuatro cámaras (B).

La cantidad de espermatozoides almacenada en cada espermateca podría ser controlada, como ocurre en *L. terrestris*, que almacena espermatozoides predominantemente en el par de espermatecas posterior cuando no hay inyección de alohormonas (Koene *et al.* 2005, véase más adelante). Garvín *et al.* (2003) también observaron que el segundo par de espermatecas parecía ser el principal receptor de espermatozoides en *H. elisae*. Sin embargo, Velando *et al.* (2008) mostraron que *E. andrei* distribuye el espermatozoides equitativamente entre sus cuatro espermatecas.

La selección críptica femenina se puede conseguir también mediante inversión diferencial en la descendencia. Velando *et al.* (2006) encontraron que *E. andrei* ajustaba el esfuerzo reproductivo al grado de parentesco con la pareja y demostraron que tanto la endogamia como la exogamia causaban una gran reducción de la producción de capullos, especialmente en líneas genéticas con tasas reproductivas muy altas.

La selección sexual conduce a la evolución de estrategias que incrementan las posibilidades de fecundación del espermatozoides donado como un medio para aumentar la paternidad. Algunas de estas estrategias se han observado en lombrices de tierra. Velando *et al.* (2008) encontraron un comportamiento en *E. andrei* que podría estimular la competencia espermática. Vieron que ésta, puede ejercer un control sobre su propio volumen de eyaculación tras evaluar a sus compañeros y que donaba tres veces más espermatozoides cuando copulaba con un individuo que no era virgen. Estos aumentos eran mayores incluso cuando se copulaba con compañeros de mayor tamaño. Mariño *et al.* (2006) también encontraron un intercambio de espermatozoides en *E. andrei*, que ajustaba el volumen de espermatozoides que donaba al volumen de espermatozoides que recibía durante la cópula. Además, el volumen total de espermatozoides que encontraron en las espermatecas estaba correlacionado con la masa corporal del receptor, indicando que este ajuste se hacía de acuerdo a la calidad del compañero.

Por último, Koene *et al.* (2002) propusieron que durante la cópula, *L. terrestris* atravesaba el tegumento de su pareja con sus quetas sexuales para inyectar una alohormona producida por las glándulas quetales, que manipula la fisiología reproductiva del compañero y daña su pared corporal. La inyección de esta sustancia provoca que la cantidad de espermatozoides que se reciba sea mayor, que la distribución de

esperma entre las cuatro espermatecas sea más equitativa y que el tiempo que pasa hasta la siguiente cópula se incremente. El daño causado por la propia inyección podría implicar un coste considerable que inhibiría otro apareamiento (Koene *et al.* 2005).

#### I.4. Uso de marcadores moleculares en lombrices de tierra

A pesar del gran interés que despiertan las lombrices de tierra entre los ecólogos y el creciente uso de datos moleculares en los últimos 20 años, existen todavía pocos estudios que apliquen técnicas moleculares para la investigación de este grupo animal.

Sin embargo, el uso de estas herramientas puede (y ya lo está haciendo) revolucionar el conocimiento de la biología, ecología y evolución de las lombrices de tierra, ya que permiten identificar individuos, linajes o especies y estudiar sus relaciones. Hasta ahora, sin estas técnicas, había aspectos que no se podían abordar debido a dificultades metodológicas. En primer lugar, la identificación morfológica de lombrices de tierra es muy difícil, ya que la taxonomía clásica se ve muy limitada por la simplicidad estructural de estos animales y por la falta de caracteres estables, que muchas veces se superponen entre taxa (Pop *et al.* 2003). Además, ha sido difícil decidir si un carácter es ancestral o evolucionado ya que, debido a su cuerpo blando, el registro fósil de estos invertebrados es escaso (Pearce *et al.* 1990). Con el estudio de los caracteres morfológicos por sí solos, no se puede distinguir en un análisis filogenético la ausencia de un carácter de la pérdida secundaria del mismo (Halanych y Janosik 2006). Como consecuencia, la morfología por sí sola no puede determinar los límites de especies en algunas lombrices de tierra y las herramientas moleculares podrían ser la única manera para revelar el nivel real de biodiversidad (Proudlove y Wood 2003). Asimismo, muchos de los aspectos relativos a estrategias reproductivas, tales como selección de pareja, promiscuidad o competencia espermática, no han sido estudiados, o lo han sido de forma parcial en organismos “modelo”, quizás por la dificultad de trabajar con animales que viven “dentro” del sustrato. Esto se agrava todavía más si se habla de lombrices de tierra con estrategia ecológica endogea, que han quedado relegadas al olvido debido a la imposibilidad de su observación directa, a la dificultad de su cultivo y a sus largos ciclos biológicos. A este respecto, el análisis de marcadores moleculares, como los loci microsatélites, abre nuevas perspectivas a la resolución de estos problemas.

Los primeros trabajos sobre diversidad genética en lombrices de tierra se realizaron en los años 80 utilizando polimorfismos enzimáticos. Posteriormente, con el



desarrollo de nuevos marcadores moleculares se prestó bastante atención a la filogenia molecular, filogeografía y diversidad genética en otros anélidos, sobre todo en poliquetos, pero no tanto en lombrices de tierra, donde estos trabajos se iniciaron a principios de los años 2000, siendo el primero el de Jamieson *et al.* (2002). Es durante la última década cuando se ha visto el desarrollo de un amplio espectro de herramientas moleculares para lombrices de tierra, como los marcadores de ADN mitocondrial o nuclear, perfiles de AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), marcadores microsatélites, etc. En la Tabla I.2 se muestran las publicaciones existentes que utilizan marcadores moleculares para el estudio de las lombrices de tierra.

Los marcadores de ADN, que son estables, discretos y heredables, permiten identificar individuos, poblaciones o especies y estudiar sus relaciones evolutivas. La evolución molecular se refiere fundamentalmente a cambios sostenidos y acumulados en la secuencias de ADN que ocurren a lo largo de la historia de las especies y, por tanto, distinguen a esas especies de sus antepasados evolutivos. Una gran proporción de esos cambios en la estructura de los genes son mutaciones neutrales que no confieren ninguna ventaja o desventaja selectiva al organismo que las porta. El patrón geográfico de estas mutaciones y las tasas de cambio evolutivo puede ser distintivo dentro de las poblaciones naturales, incluso entre aquellas, que muestran estrechas relaciones de parentesco genético (clados hermanos). La filogenia molecular trata de utilizar esas características estructurales de los genes para clasificar una población (o una especie), medir la magnitud de sus relaciones evolutivas y representar esas afinidades o diferencias genéticas mediante estructuras jerárquicas. Existen numerosas técnicas moleculares que sirven para establecer relaciones genéticas a diferentes niveles taxonómicos (Avice 1994, Taberlet *et al.* 1998, Ewens 2000, Nei y Kumar 2000, Felsenstein 2004).

Especie o grupo estudiado	Marcadores moleculares	Referencias
<i>Allolobophora molleri</i>	Alozimas	Barros <i>et al.</i> (1992)
<i>Allolobophora</i>	ADN mitocondrial (COI y 16S)	Pop <i>et al.</i> (2005)
<i>Amyntas gracilis</i>	ADN mitocondrial (NADH)	Chang <i>et al.</i> (2005)
<i>Amyntas wulinensis</i>	ADN mitocondrial (COI)	Chang <i>et al.</i> (2007)
<i>Aporrectodea</i>	Alozimas	Mezhzherin <i>et al.</i> (2008)
	ADN mitocondrial y nuclear (COII, 12S, 16S, NADH, tRNAs y 28S)	Pérez-Losada <i>et al.</i> (2009)
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Alozimas	Cobolli Sbordoni <i>et al.</i> (1987), Bolotetskii <i>et al.</i> (1996)
	RAPDs	Lentzsch y Golldack (2006)
<i>Aporrectodea rosea</i>	Alozimas	Terhivuo y Saura (1993b, 1996, 1997)
<i>Aporrectodea tuberculata</i>	Alozimas	Stille <i>et al.</i> (1980)
<i>Dendrobaena octaedra</i>	Alozimas	Terhivuo <i>et al.</i> (1987) Terhivuo y Saura (1990, 1996, 1997), Hansen <i>et al.</i> (2006), Haimi <i>et al.</i> (2007), Simonsen <i>et al.</i> (2008)
	ADN mitocondrial (COI)	Cameron <i>et al.</i> (2008)
<i>Eisenia andrei</i> y <i>E. fetida</i>	ADN mitocondrial y nuclear (COI y 28S)	Pérez-Losada <i>et al.</i> (2005)
<i>Eisenia fetida</i>	Alozimas	Bolotetskii <i>et al.</i> (1994), Bolotetskii y Kodolova (2002, 2005)
<i>Eiseniella tetraedra</i>	Alozimas	Terhivuo y Saura (1996, 1997, 2008), Terhivuo <i>et al.</i> (1994, 2002)
<i>Lumbricus rubellus</i>	Alozimas	Enckell <i>et al.</i> (1986), Peles <i>et al.</i> (2003), Simonsen y Scott-Fordsmand (2004), Zhukovskaya <i>et al.</i> (2005), Shepeleva <i>et al.</i> (2008)
	Microsatélites	Harper <i>et al.</i> (2006)

**Tabla I.2.** (Continúa en la página siguiente). Lombrices de tierra estudiadas con marcadores moleculares desde 1980 hasta el momento. Tabla adaptada de Dupont (2009).

Especie o grupo estudiado	Marcadores moleculares	Referencias
<i>Lumbricus terrestris</i>	ADN mitocondrial (NADH)	Field <i>et al.</i> (2007)
	Genoma mitocondrial completo	Boore y Brown (1995)
	Microsatélites	Velavan <i>et al.</i> (2007)
	RAPDs	Kautenburger (2006)
<i>Metaphire formosae</i> (complejo)	ADN mitocondrial (COI, 16S y NADH)	Chang <i>et al.</i> (2008a)
<i>Metaphire sieboldi</i>	ADN mitocondrial (COI y 16S)	Minamiya <i>et al.</i> (2009)
<i>Octolasion</i>	ADN mitocondrial y nuclear (COI, 16S y 18S)	Pop <i>et al.</i> (2008a)
<i>Octolasion cyaneum</i>	Alozimas	Terhivuo y Saura (1993a, 1996, 1997, 2003)
<i>Octolasion tyrtaeum</i>	Alozimas	Jaenike <i>et al.</i> (1980), Terhivuo y Saura (1993a, 1997)
<b>Hormogastridae</b>	ADN mitocondrial (COII)	Heethoff <i>et al.</i> (2004)
	Alozimas	Cobolli Sbordoni <i>et al.</i> (1992)
<b>Lumbricidae</b>	ADN mitocondrial (COI y 16S)	Briones <i>et al.</i> (2009)
	ADN mitocondrial y nuclear (COI, 16S y 18S)	Pop <i>et al.</i> (2003, 2007)
	ADN mitocondrial (COI y 16S) y AFLP	King <i>et al.</i> (2008)
<b>Megascolecidae y Lumbricidae</b>	ADN mitocondrial (COI)	Huang <i>et al.</i> (2007), Chang <i>et al.</i> (2008b)
<b>Crassiclitellata</b>	ADN mitocondrial y nuclear (12S, 16S y 28S)	Jamieson <i>et al.</i> (2002)

**Tabla I.2.** (Viene de página anterior). Lombrices de tierra estudiadas con marcadores moleculares desde 1980 hasta el momento. Tabla adaptada de Dupont (2009).

El ADN mitocondrial es una herramienta muy valiosa para estudios evolutivos, debido a su fácil aislamiento, gran número de copias, ausencia de recombinación, estructura más o menos conservada en animales y rango de tasas evolutivas en diferentes regiones de la molécula (Harrison 1989, Wolstenholme 1992, Simon *et al.* 1994, Lunt 1996). El ADN mitocondrial de los metazoos es uniforme en su contenido génico, incluyendo además de una región no codificante o región control, 37 genes estructurales (codificantes de proteínas y ribosómicos), entre los que se incluye el gen citocromo C oxidasa (Saccone *et al.* 1999).

La subunidad I del gen citocromo C oxidasa (COI) se ha usado para el estudio de relaciones intraespecíficas e intragenéricas en anélidos (Black *et al.* 1997, Bely y Wray 2004, Hurtado *et al.* 2004, Jolly *et al.* 2005, Ocegüera-Figueroa *et al.* 2005, Halanych y Janosik 2006), y más concretamente en lombrices de tierra (Pop *et al.* 2003, Chang y Chen 2005, Csuzdi *et al.* 2005, Pérez-Losada *et al.* 2005, Pop *et al.* 2005, Huang *et al.* 2007), debido a su rápida variación sobre todo en la tercera posición de los codones. Las posiciones primera y segunda, que normalmente causan la sustitución de aminoácidos, podrían ser útiles para estudios intergenéricos o interfamiliares, niveles en los que las terceras posiciones es probable que estén saturadas por haber experimentado sustituciones múltiples (Halanych y Janosik 2006). Hebert *et al.* (2003a) pretenden difundir la aplicación del gen COI como un sistema de identificación de especies animales (un "código de barras" de ADN) y proponen la creación de una base de datos para este gen, argumentando que los cebadores universales existentes son muy robustos (permiten amplificar esta región en la mayoría de filos animales) y que tiene un mayor rango de "señal filogenética" que otros genes (su tasa de evolución es tres veces mayor que la de los genes ribosómicos 12S ó 16S), permitiendo diferenciar especies muy parecidas y grupos filogeográficos dentro de una misma especie. Actualmente ya existen iniciativas, como el programa BOLD (Barcode of Life Data Systems, <http://www.boldsystems.org/views/login.php>), que recopilan datos de códigos de barras de ADN.

La enzima citocromo C oxidasa es indispensable para aquellos organismos con respiración aerobia (Adkins *et al.* 1996). Es el componente terminal y probablemente el que determina la tasa (Poyton *et al.* 1988) en la cadena respiratoria mitocondrial, encontrándose embebida en la membrana de este orgánulo (Schmidt *et al.* 1997). En su

forma activa en mamíferos, es una enzima dimérica; uno de sus monómeros con tres subunidades (I-III), codificado por el ADN mitocondrial y el otro, con diez subunidades, codificado por el ADN nuclear (Cooper *et al.* 1991). Las subunidades codificadas por el ADN mitocondrial, son las responsables de las funciones catalíticas conocidas, mientras que el papel de las subunidades codificadas en el núcleo todavía no se conoce demasiado bien (Taanman 1997).

Otro de los genes mitocondriales utilizado y que ha resultado ser informativo para delimitar especies ha sido el gen ribosómico 16S (Blaxter 2004), región que es especialmente útil en las relaciones de nivel intraespecífico e intragenérico (Halanych y Janosik 2006). Pop *et al.* (2003) consideran que las regiones del 16S rRNA y COI tienen un valor taxonómico complementario al nivel de género y especie para lombrices de tierra, presentando una utilidad limitada a niveles superiores (Pop *et al.* 2008b, Briones *et al.* 2009).

Los genes ribosómicos nucleares también han sido muy utilizados para la filogenia de anélidos. El hecho de que contengan regiones que presentan distinta cantidad de variación, hace que sean útiles para obtener información a distintos niveles filogenéticos. La subunidad pequeña del ribosoma (18S) se ha utilizado para estudiar las relaciones intra-anelidianas y el hecho de que tenga regiones conservadas entre animales ha permitido el desarrollo de cebadores universales para su amplificación (Halanych y Janosik 2006). Este gen ha fracasado a la hora de dilucidar las relaciones profundas de los anélidos, pero ha sido muy útil dentro de Familias reconocidas (Nygren y Sundberg 2003, Bleidorn 2005), dentro de órdenes (Erseus *et al.* 2002) y ocasionalmente identificando taxones hermanos (Rousset *et al.* 2004). Pop *et al.* (2003) encuentran un 57% de nucleótidos informativos en este gen, frente al 96%-97% que presentan los genes 16S y COI, llegando así a la conclusión de que el 18S rRNA tiene valor discriminatorio en niveles taxonómicos superiores. La subunidad grande del ribosoma (28S) contiene regiones más variables y otras más conservadas que el 18S y así, podría ser utilizado a lo largo de una historia evolutiva más amplia (Halanych y Janosik 2006). Esta región ha demostrado tener mayor resolución también a niveles taxonómicos superiores (Pérez-Losada *et al.* 2005, 2009).

Los microsatélites, también conocidos como SSRs (“Simple Sequence Repeats”) o STRs (“Short Tandem Repeats”), son secuencias cortas de ADN no codificante, constituidas por grupos de uno a seis nucleótidos que se repiten en tandem y que se encuentran extendidos por los genomas nucleares de la mayoría de taxones (Tóth *et al.* 2000). La amplificación de estos loci mediante reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR, Saiki *et al.* 1988) con cebadores flanqueantes a la repetición, genera fragmentos cuyo tamaño depende del número de repeticiones de esta secuencia, lo que hace sencilla la caracterización de los alelos (fragmentos de ADN de diferente longitud) de estos loci. Estas regiones tienen una serie de ventajas frente a otros marcadores moleculares:

- Su tasa de mutación es mayor que las del resto del genoma, mostrando un gran polimorfismo (Jarne y Lagoda 1996).
- Se necesita poco ADN para su estudio, ya que presentan menor longitud que otros loci secuenciados (100-300 pares de bases *vs.* 500-1500 pares de bases), siendo posible su amplificación mediante PCR en muestras de ADN degradado (Selkoe y Toonen 2006). Además pueden detectarse a partir de muchas fuentes de ADN, incluyendo esperma procedente de distintas espermatecas (Strassmann *et al.* 1997).
- Su herencia es codominante, por lo que se pueden distinguir todos los homocigotos entre sí y éstos de los heterocigotos.
- No hay peligro de contaminación con el ADN procedente de otras especies porque los cebadores para amplificar regiones microsatélite son muy específicos, cosa que sí ocurre cuando se utilizan cebadores universales (Selkoe y Toonen 2006).

La automatización de los microsatélites es fácil y su reproducibilidad es alta (Oliveira *et al.* 2006) pero no lo es tanto su desarrollo, que implica trabajo intensivo en el laboratorio durante meses (Selkoe y Toonen 2006). Además en este punto, la especificidad de los cebadores para amplificar estas regiones constituye una desventaja,

ya que éstos deben ser diseñados de *novo* para la mayoría de las especies que se examinan por primera vez (Zane *et al.* 2002).

La principal desventaja de los microsatélites es que se conoce muy poco sobre sus mecanismos de mutación (Li *et al.* 2002) y muchas veces se subestima el nivel de divergencia debido a homoplasia, o se detecta un déficit de heterocigosis por causa de la presencia de alelos nulos (Selkoe y Toonen 2006). Además, aunque la mayoría de microsatélites son neutrales y no están afectados por la selección, se ha visto que la expansión del número de repeticiones puede provocar enfermedades en humanos (Oliveira *et al.* 2006)

Con todo, una vez que se cuenta con los cebadores para una determinada especie, la relativa facilidad en el uso rutinario de los microsatélites y la cantidad y calidad de la información que genera han convertido al análisis de los microsatélites en una herramienta poderosa para la identificación de individuos y análisis de parentesco y son también utilizados en estudios de flujo génico, cálculo del tamaño efectivo de la población, migraciones o cálculo de distancias de dispersión, u otros estudios poblacionales (Queller *et al.* 1993, Oliveira *et al.* 2006).

La información genética disponible procedente de lombrices de tierra todavía es escasa y hasta ahora, sólo se habían publicado datos genéticos basados en microsatélites en dos especies de lombrices de tierra, *Lumbricus rubellus* (Harper *et al.* 2006) y *L. terrestris* (Velavan *et al.* 2006). En ambas especies, los microsatélites resultaron ser altamente polimórficos. Harper *et al.* (2006) intentaron sin éxito, la amplificación de los marcadores que desarrollaron para *L. rubellus*, en otras especies, *L. terrestris* y *L. castaneus*.

Este tipo de marcadores han sido utilizados recientemente por Sahm *et al.* (2009) para estudiar las preferencias de apareamiento en *L. terrestris*.

## **I.5. Objetivos**

El suelo es un medio muy críptico que dificulta el estudio de sus organismos por mera observación. Por eso han sido pocos los estudios que se han realizado para estudiar la selección de pareja en lombrices de tierra y éstos no se han realizado nunca con especies endógenas. Las relaciones biogeográficas entre las poblaciones de la especie *H. elisae*, así como sus relaciones con especies próximas son mal conocidas. Tampoco se conoce nada sobre la filogenia de los Hormogastridae, ya que las aportaciones hasta el momento han sido meras descripciones morfológicas, y el único estudio genético se realizó con alozimas e incluyó una pequeña proporción de las especies descritas. Por todo ello, en el presente trabajo se pretenden utilizar marcadores moleculares para contribuir al conocimiento del comportamiento de selección de pareja de *H. elisae* y de las relaciones biogeográficas de distintas poblaciones de esta especie, contextualizando su situación con un estudio de las relaciones filogenéticas de toda la Familia.

### **Objetivos particulares:**

#### **1) Estudio microgeográfico y selección sexual de *H. elisae* en El Molar (capítulos II y III)**

### CAPÍTULO II

1. Encontrar en el ADN de *H. elisae* regiones con repeticiones microsatélite suficientemente polimórficas y diseñar cebadores para amplificarlas.
2. Estudiar el polimorfismo de las regiones amplificadas con la finalidad de evaluar su validez para análisis de paternidad y selección sexual.
3. Probar los marcadores en poblaciones diferentes de *H. elisae* y así valorar su especificidad.



### CAPÍTULO III

4. Conocer el número de parejas con las que copula *H. elisae*, al menos en una temporada reproductiva.
5. Estudiar algunos aspectos de la selección de pareja en *H. elisae*, intentando averiguar si existe selección por tamaño o si el éxito de apareamiento de un individuo depende de su talla o de su variabilidad genética.
6. Analizar por separado el esperma contenido en las cuatro espermatecas de los individuos de *H. elisae*, para descubrir si en todas ellas se almacena el esperma de todas las cópulas o hay un almacenamiento diferencial en distintas espermatecas del esperma procedente de diferentes individuos.
7. Obtener información sobre el movimiento de los individuos de *H. elisae* y su estructura genética a pequeña escala en la población de El Molar.

### **2) Filogeografía de *H. elisae* y especiación críptica (capítulos IV y V)**

### CAPÍTULO IV

8. Analizar las posibles diferencias morfológicas entre las poblaciones de *H. elisae*.
9. Conocer la diversidad genética de la especie de estudio.
10. Conocer la variabilidad genética y el flujo génico existente entre las poblaciones de *H. elisae*.
11. Establecer las relaciones filogenéticas y filogeografía de la especie.
12. Obtener información sobre la historia demográfica y evolutiva de *H. elisae*.

## CAPÍTULO V

Dada la naturaleza preliminar del estudio realizado en el capítulo IV, se plantea como necesario investigar con mayor profundidad el problema de los hormogástridos del centro de la Península Ibérica y desentrañar sus niveles reales de biodiversidad.

13. Estudiar la diversidad genética de un mayor número de poblaciones de *H. elisae*, analizando regiones génicas de origen mitocondrial y nuclear con distinto nivel de variación.
14. Establecer la filogenia de *H. elisae* incluyendo las nuevas poblaciones.
15. Determinar el límite y número de las especies crípticas encontradas.
16. Conocer si los valores de diversidad genética de *H. elisae* se ven influenciados por los factores del suelo o si responden a eventos históricos.
17. Examinar si las variaciones encontradas en el tamaño de los especímenes son consecuencia de condiciones diferentes en el suelo o si están relacionadas con la evolución genética.

### **3) Filogenia molecular de Hormogastridae (capítulos VI, VII y VIII)**

## CAPÍTULO VI

18. Conocer la diversidad genética de toda la Familia Hormogastridae para contextualizar la situación de *H. elisae* utilizando marcadores moleculares de origen mitocondrial y nuclear con distinto nivel de variación y la mayoría de las especies descritas.
19. Establecer las relaciones filogenéticas de la Familia desde el punto de vista molecular.

20. Datar los principales eventos de diversificación de la Familia con base en los eventos ocurridos en la cuenca Mediterránea a lo largo de la historia.
21. Calcular una tasa de sustitución del gen COI específica para hormogástridos.
22. Detectar alguna posible relación filogenética con los factores del suelo.

## CAPÍTULO VII

Este capítulo surge a la luz de los resultados del capítulo VI, que plantean la necesidad de:

23. Elaborar una nueva propuesta taxonómica en los Hormogastridae y una reorganización de sus especies, integrando la información morfológica y molecular.

## CAPÍTULO VIII

24. Describir la nueva especie encontrada en Sant Joan de les Abadesses (Gerona), durante las campañas de muestreo realizadas para cubrir los objetivos del capítulo VI.

**II. Diseño de cebadores para amplificar regiones microsatélite**  
**en la lombriz de tierra *Hormogaster elisae***



## **II. Diseño de cebadores para amplificar regiones microsatélite en la lombriz de tierra *Hormogaster elisae***

(Publicación: Novo M, Velavan TP, Almodóvar A, Schulenburg H, Díaz Cosín DJ, Michiels NK (2008) Microsatellite markers for the drought-resistant earthworm *Hormogaster elisae*. *Molecular Ecology Resources* 8: 901-903)

### **RESUMEN**

Se han identificado y caracterizado diez regiones microsatélite y se han diseñado cebadores para su amplificación a partir de una librería genómica de la lombriz de tierra *Hormogaster elisae*. La caracterización de estos loci usando 26 individuos reveló altos niveles de diversidad genética, mostrando entre 8 y 25 alelos por locus y altos niveles de heterocigosis. Estos loci serán usados para análisis de paternidad y selección sexual.

### **ABSTRACT**

We developed and characterized ten highly polymorphic microsatellite loci from an SSR-enriched genomic DNA library of the earthworm *Hormogaster elisae*. Characterization of these loci using 26 individuals revealed high levels of genetic diversity, 8 to 25 alleles per locus and high levels of heterozygosity. These loci will be used for paternity analysis and sexual selection studies.

## II.1. Introducción

Los loci que contienen microsatélites o repeticiones simples en tandem, son marcadores moleculares muy potentes en genética de poblaciones y pruebas de paternidad, ya que son de rápida evolución, se encuentran en todo el genoma nuclear, normalmente tienen varios alelos por locus y son de herencia codominante (Jarne y Lagoda 1996).

El objetivo de este capítulo es encontrar regiones con este tipo de repeticiones en el genoma de la lombriz de tierra *Hormogaster elisae* y diseñar cebadores para amplificarlas de una forma consistente en los individuos de esta especie. La intención es conseguir una herramienta molecular que permita el estudio del comportamiento sexual de esta especie, imposible de realizar por observación directa, debido a su naturaleza endogea. Ya se han desarrollado marcadores de este tipo para su uso en otras lombrices de tierra, como *Lumbricus rubellus* (Harper *et al.* 2006) y *Lumbricus terrestris* (Velavan *et al.* 2007). Sin embargo, debido a la especificidad de los cebadores, su uso en especies diferentes no siempre da buenos resultados y es necesario el aislamiento de *novo* de la mayoría de especies que se examinan por primera vez (Zane *et al.* 2002). Por esta razón, se decidió diseñar por primera vez, cebadores para amplificar regiones microsatélite en esta especie de lombriz de tierra, *H.elisae*, que nos permitirán abordar trabajos hasta ahora imposibles o extremadamente difíciles. En este capítulo se describe el protocolo exhaustivamente para permitir su reproducción.

## II.2. Materiales y métodos y resultados

Las regiones con repeticiones microsatélite se identificaron a partir de un individuo recogido en El Molar (Madrid, España: N 40°44'22,9'', W 003°33'53,1''). Se construyó una librería genómica enriquecida en repeticiones en tandem sencillas a partir de este espécimen siguiendo el método descrito por Velavan *et al.* (2007). Los pasos a seguir fueron los siguientes (véase Figura II.1 para un esquema general).

### II.2.1. Extracción de ADN

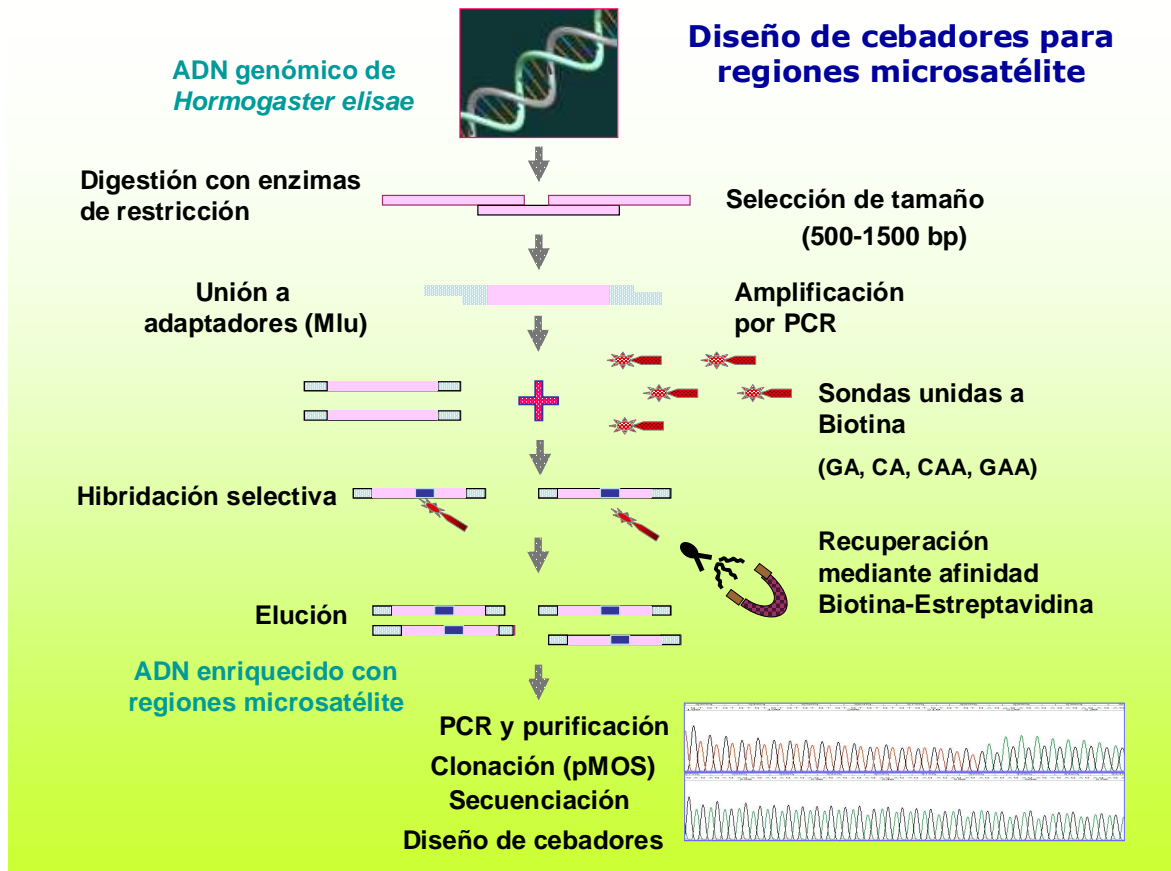
El individuo seleccionado de *H. elisae* se limpió cuidadosamente, retirando los restos de suelo y se tomaron muestras de tejido fresco de 100 mg de la pared del cuerpo en las partes anterior y posterior, eliminando el tubo digestivo. A partir de esta muestra de tejido se aisló el ADN genómico total usando el método CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) ligeramente modificado como se detalla en Schulenburg *et al.* (2001). En primer lugar la muestra se sometió a digestión durante 2 horas a 55°C con agitación en 3 ml de tampón CTAB y 60 µl de proteinasa K (10mg/ml). El ADN se extrajo añadiendo dos volúmenes de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y centrifugando 7 minutos a 13.000 revoluciones por minuto (rpm). Al sobrenadante se le añadió 1 volumen de isopropanol a -20°C para precipitar el ADN. Éste se recuperó y se realizaron varios centrifugados para eliminar totalmente el sobrenadante. A continuación se procedió al lavado con 1 ml de etanol de 70° y centrifugado a 6.000 rpm durante 1 minuto. Se eliminaron los restos de alcohol y se dejó secar el precipitado a 60°C durante 15 minutos. Finalmente se resuspendió en 300 µl de tampón TE y 7,5 µl de ARNasa (10mg/ml) y se incubó a 55°C para la completa disolución del ADN. Se comprobó el resultado de la extracción en un gel de agarosa al 1% (Figura II.2) y se midió la concentración del producto final en un espectofotómetro, arrojando un valor de 80 ng/µl.

### II.2.2. Digestión con enzimas de restricción

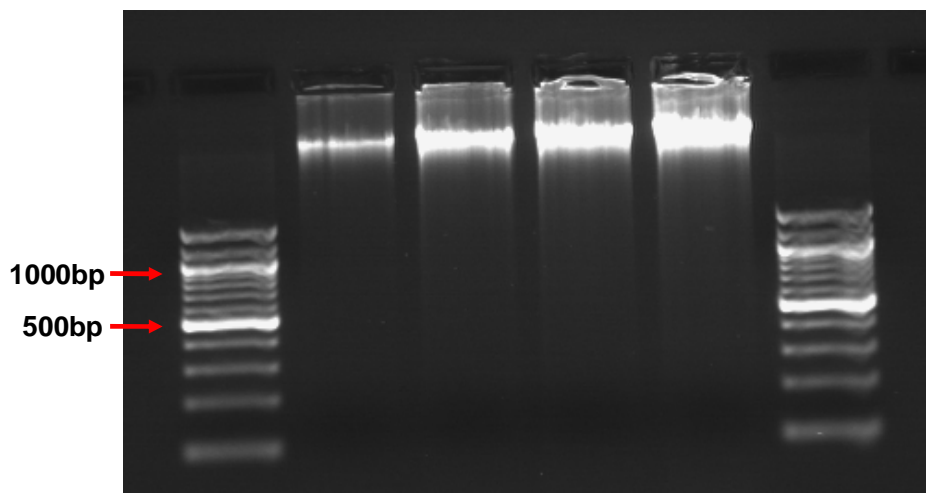
Se hizo una prueba preliminar con distintas enzimas de restricción y sus combinaciones (Hae III, Dra I, Rsa I, Hae III+ RsaI, Hae III+ Dra I, Dra I+ Rsa I) y distintos tiempos de incubación (2 horas y 4 horas) para seleccionar aquella cuya digestión del ADN objeto diera lugar a fragmentos comprendidos entre 500 y 1.500 pares de bases. Se utilizan enzimas que producen fragmentos con extremos romos, para facilitar la posterior unión a los adaptadores (véase sección II.2.3). Tras la purificación de ADN a partir del gel de agarosa (véase más adelante), esto resulta en fragmentos de 300 a 1.500 pares de bases, que es el rango de tamaño óptimo para la identificación de regiones microsatélite y diseño de cebadores. Un fragmento más grande no permitiría una secuenciación adecuada tras su clonación y un fragmento más pequeño



imposibilitaría el diseño de cebadores en la región de ADN que flanquea las repeticiones microsatélite.



**Figura II.1.** Esquema general del procedimiento para la construcción de la genoteca enriquecida en regiones microsatélite. Figura adaptada de la original en Velavan (2009).



**Figura II.2.** Gel de agarosa con las bandas obtenidas tras la extracción de ADN mediante el método CTAB. En el primer y último carril se cargaron los marcadores de tamaño. bp: pares de bases.

Las reacciones de restricción se llevaron a cabo según las indicaciones de New England Biolabs en un volumen total de 10 µl, añadiendo 2 unidades de enzima, 1X de tampón (New England Biolabs) y 500 ng de ADN e incubando a 37°C durante 2 ó 4 horas con una etapa final de 15 minutos a 70°C para desactivar la enzima. Las tres enzimas produjeron digestión y Hae III fue la única que cortó el ADN en fragmentos del rango de tamaño deseado. Sin embargo es preferible utilizar una combinación de enzimas para obtener fragmentos diferentes. Así, las combinaciones Hae III+Rsa I y Hae III+Dra I serían las más apropiadas. La combinación seleccionada para la siguiente etapa fue Hae III+ RsaI (Figura II.3). La diferencia en el tiempo de incubación no afectó al tamaño de los fragmentos recuperados.

Se repitió la reacción de restricción con la combinación seleccionada de enzimas (Hae III+ RsaI) aplicada a 10 µg de ADN en un volumen final de 60 µl. A continuación se realizó una electroforesis cargando toda la muestra en un gel de agarosa de alta resolución al 1,5%, que se efectuó durante 3 horas a 100 voltios en tampón 1X TAE. De este gel se recuperaron los fragmentos comprendidos entre 500 y 1500 pares de bases mediante purificación con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante. Sólo se tiñeron con bromuro de etidio aquellos carriles donde se habían cargado los marcadores de tamaño, para poder recuperar la muestra sin restos de este componente. Tras cortar la región seleccionada del gel, se tiñó ésta también con bromuro de etidio para comprobar que se había cortado adecuadamente. Posteriormente se comprobó en otro gel de agarosa que el producto de purificación contenía los fragmentos del tamaño seleccionado.

### II.2.3. Unión a adaptadores

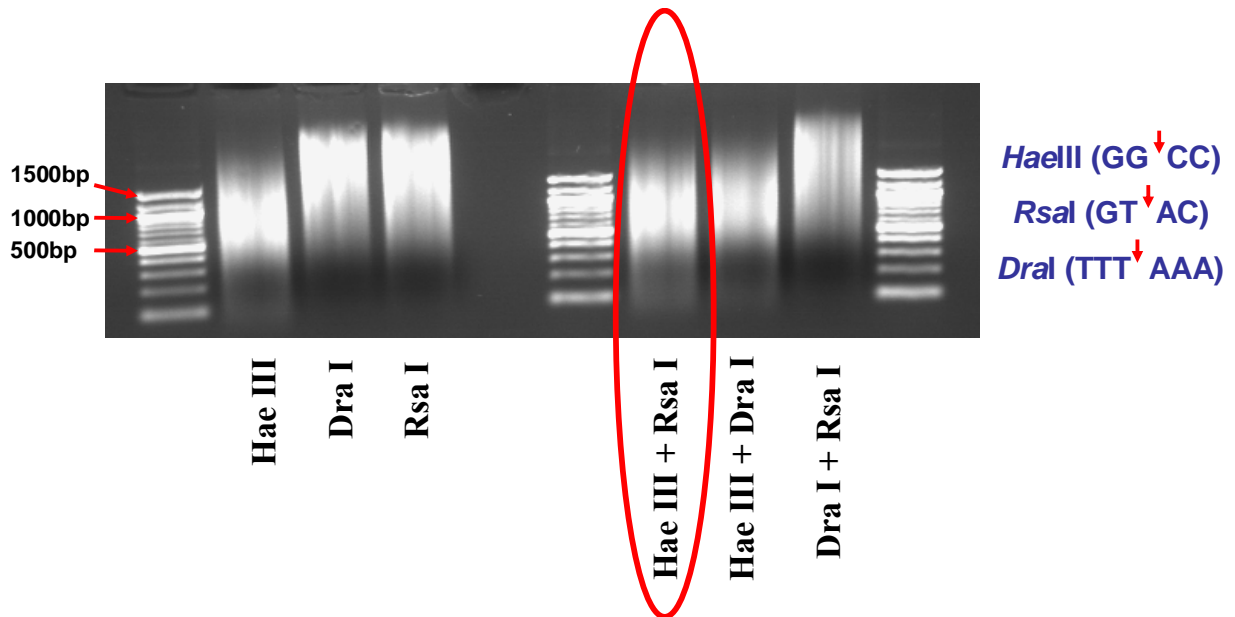
Los fragmentos se ligaron a los adaptadores MluI (Edwards *et al.* 1996):

MluF: 5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3'

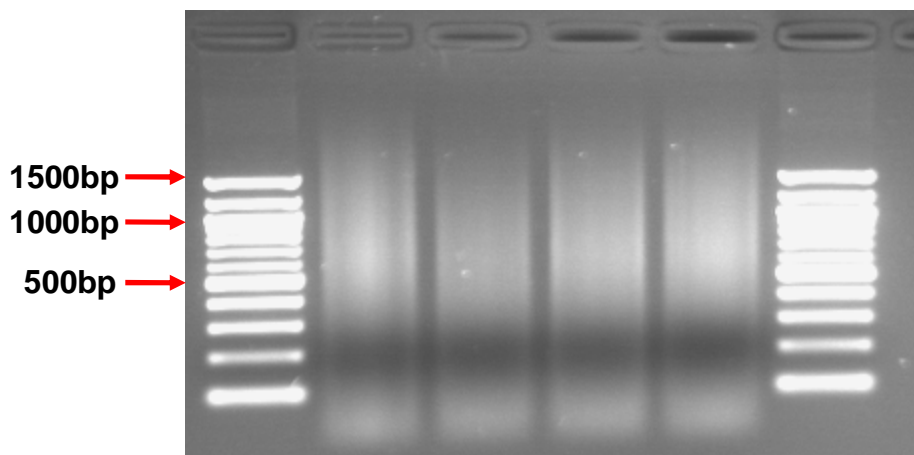
MluR: 5'pTAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCAC 3'

Estos adaptadores fueron previamente fosforilados y unidos en doble cadena y a continuación unidos a nuestros fragmentos de ADN mediante una incubación a 16°C durante una noche en una reacción que incluyó 1X de tampón NEB, 1 µl de ligasa de

ADN T4 (NEB, aislada a partir del bacteriófago T4), 5 pm de los adaptadores preparados y 30 ng de la mezcla de fragmentos de ADN, en un volumen final de 15 µl. A continuación se llevó a cabo una PCR utilizando MluF como cebador para comprobar en un gel de agarosa que la reacción de unión fue exitosa (Figura II.4) y recuperar sólo aquellos fragmentos que estaban unidos a los adaptadores para que durante la hibridación (véase sección II.2.4) no hubiera competencia con los que no lo estaban.



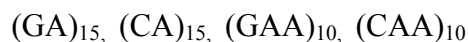
**Figura II.3.** Gel de agarosa con los resultados de la prueba preliminar de digestión con enzimas de restricción durante 2 horas. En la parte derecha se indican las dianas de restricción para cada enzima. La combinación seleccionada de enzimas se muestra rodeada en rojo. bp: pares de bases.



**Figura II.4.** Gel de agarosa con cuatro carriles en los que se ha cargado la PCR realizada con la reacción de unión a adaptadores como producto inicial y MluF como cebador. En el primer y último carril se cargaron los marcadores de tamaño. bp: pares de bases.

#### II.2.4. Enriquecimiento

Se realizó un enriquecimiento, es decir, una selección de los fragmentos que contenían regiones con repeticiones. Para ello, el producto final de la PCR realizada con los adaptadores se sometió a hibridación con las siguientes sondas de oligonucleótidos unidos a biotina en el extremo 5':

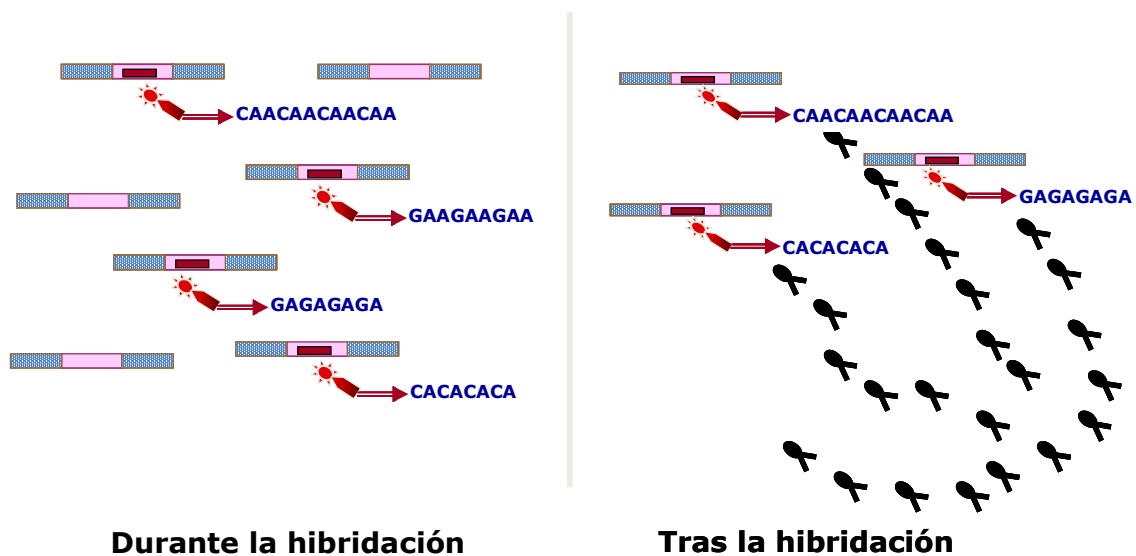


Para seleccionar los fragmentos que hibridaban con las sondas y eliminar los que no lo hacían, se usó el siguiente principio: la biotina tiene gran afinidad por la estreptavidina y usando perlas magnéticas (partículas de hierro) recubiertas de esta última, se pueden separar utilizando una superficie magnética. En primer lugar se limpiaron las perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads, DYNAL, Invitrogen) de la solución en la que las suministra el fabricante. Para ello se utilizaron 100 µl de la preparación comercial, en un tubo de capacidad 0,5 ml que se colocó en un separador magnético (Figura II.5). Se desechó el sobrenadante y se realizaron varios lavados con 400 µl de tampón de lavado 1X [NaCl 1M, TE (pH 8) 5mM, EDTA 0,5 mM], resuspendiendo finalmente en 100 µl de este mismo tampón. A continuación se añadió una concentración de 10 pM de cada sonda de oligonucleótidos y se incubó durante 15 horas a temperatura ambiente. Se realizó otro lavado con 200 µl de tampón de lavado utilizando de nuevo el separador magnético para eliminar los oligonucleótidos que no se unieron a la perlas y se suspendió finalmente en 50 µl de tampón SSC 6X. Por último, se procedió a la hibridación, en un volumen final de 21 µl, 20X de tampón SSC, 20 pM del cebador MluF y 100 ng del producto de la PCR realizada con los adaptadores (sección II.2.3). Esta mezcla se incubó a 94°C durante 5 minutos, a 65°C durante 30 minutos (mezclando mediante pipeteo cada 10 minutos) y a 70°C durante 2 horas. Tras la hibridación, para eliminar los fragmentos de ADN que no hibridaron con los oligonucleótidos (es decir, para recuperar sólo aquellos fragmentos con repeticiones) se separaron de nuevo las fases con el separador magnético y se realizaron cuatro lavados con 1 ml de tampón SSC 2X, otros cuatro con 1 ml de SSC 1X y un último con 100 µl de TE (para eliminar restos de sales). Finalmente se suspendió en 50 µl de TE. En este momento el producto es una librería genómica enriquecida, es decir, fragmentos de ADN con repeticiones microsatélites y unidos a adaptadores de secuencia conocida

(véase Figura II.6). Se realizó una PCR con 1 µl de este producto, usando como cebador MluF y se purificó con el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante.



**Figura II.5.** Separador magnético que se utilizó para separar los fragmentos ricos en regiones microsatélite. Se observa en el interior del eppendorf que las perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina (de color rojizo) se ven atraídas por la superficie magnética.



**Figura II.6.** Principio utilizado para el enriquecimiento. Durante la hibridación (izquierda), los fragmentos con repeticiones se unen a las sondas unidas a biotina. Éstos se separan tras la hibridación (derecha) gracias a la afinidad de la biotina por estreptavidina, cuyas perlas se separan por atracción magnética. En la práctica, la unión de los oligonucleótidos con biotina-perlas de estreptavidina se realiza antes de la hibridación, pero la figura sólo pretende aclarar la idea básica del procedimiento.

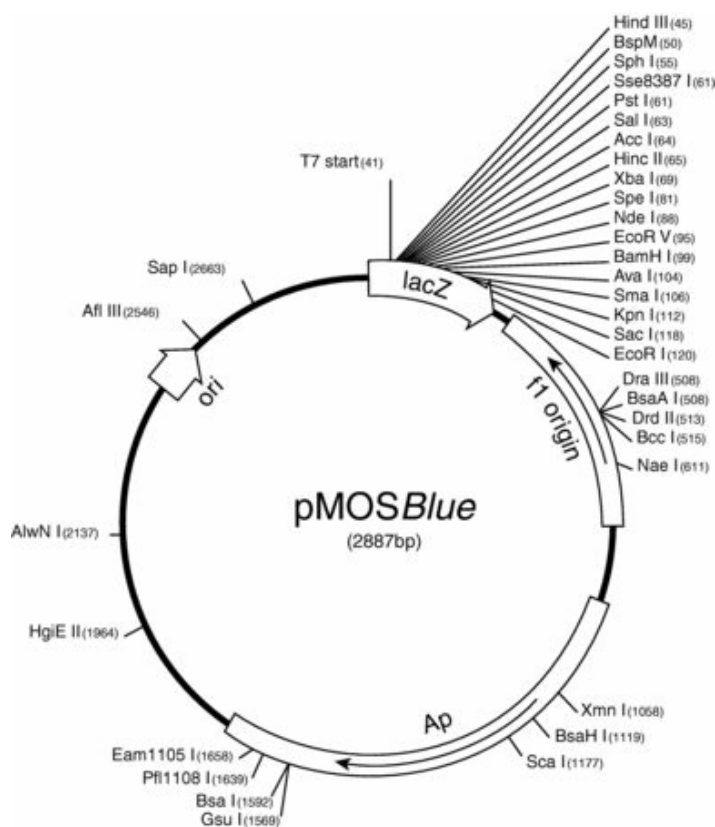
### II.2.5. Clonación y secuenciación

Los fragmentos recuperados se clonaron para separarlos y obtener un gran número de copias de cada uno y entonces poder proceder a su secuenciación. Para la clonación, se utilizaron el vector pMOS y células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  con el kit de clonación pMOS blunt end ligation kit (Amersham Biosciences). pMOS es un plásmido con un gen de resistencia a la Ampicilina, para seleccionar eventos de transformación (sólo crecen aquellas bacterias con plásmido en su interior cuando se cultivan en placa en un medio con este antibiótico) y que dispone de un “polylinker” (secuencia con múltiples dianas únicas de enzima de restricción) situado en el inicio del gen *lacZ'*, que codifica para una parte funcional de la  $\beta$ -galactosidasa. En ausencia de inserto, la bacteria en un medio con el inductor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido) y del sustrato X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D- galactopiranósido), produce  $\beta$ -galactosidasa, que degrada el sustrato X-gal, produciendo 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo, un compuesto de color azul intenso, por lo que las colonias aparecen de este color. Si hay un inserto, se interrumpe el gen *lacZ'*, la bacteria no produce  $\beta$ -galactosidasa, y las colonias aparecen blancas. Este método de coloración permite identificar de manera simple las bacterias con plásmidos recombinantes (Figura II.7). El procedimiento (que se repitió varias veces para obtener un número suficiente de clones) fue el siguiente:

#### II.2.5.a. Preparación del inserto y unión al vector

Antes de proceder a la clonación es necesaria una preparación adecuada del inserto para que contenga extremos romos, al igual que el vector pMOS (Figura II.7). El producto de la PCR a partir de la genoteca enriquecida (sección 1.2.4.) contiene colas de poliA que sobresalen debido a la capacidad de la enzima polimerasa para sintetizar sin necesidad de una secuencia complementaria. Es necesaria la eliminación de estos restos de poliA y también la fosforilación de los insertos para facilitar su unión al vector pMOS con extremos romos defosforilados. Esta preparación se realiza mediante una reacción con la enzima pK (polishing kinase) contenida en el kit de clonación, en un volumen final de 10  $\mu$ l y según las concentraciones y reactivos indicadas por éste, con 20 ng del producto de PCR. Se incubó durante 40 minutos a temperatura ambiente (25°C) y se desactivó la enzima a 80°C durante 10 minutos. La unión del inserto al

vector se realizó añadiendo al producto de la reacción anterior 1 µl de vector pMOS y 1 µl de ligasa T4 contenidos en el kit. Se incubó durante 14 horas a 22°C.



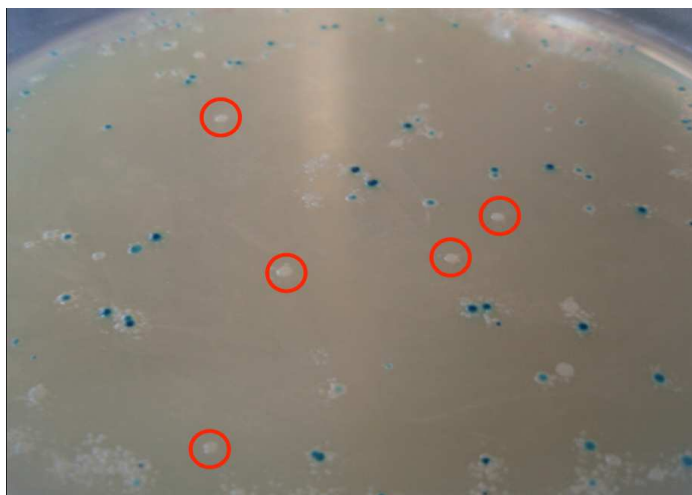
**Figura II.7.** Mapa del vector pMOSBlue utilizado para la clonación.

### II.2.5.b. Transformación

Los plásmidos recombinantes se introdujeron en células competentes de *E. coli* por choque térmico. Se hizo un primer intento con la técnica de la electroporación, ya que teóricamente es mucho más eficiente para obtener un número mucho mayor de clones en un único evento de transformación, pero resultó fallido. Se mezclaron 6 µl del producto obtenido en la sección II.2.5.a con 75 µl de *E. coli*. Esto se mantuvo durante media hora en hielo y se incubó durante 1 minuto y 45 segundos a 42°C. Se añadió 1 ml de LB-agar con ampicilina (1 µl de ampicilina (100mg/ml) por cada ml de agar) y se incubó durante 1 hora a 37°C.

### II.2.5.c. Selección de clones con el inserto

El producto obtenido en la sección II.2.5.b, se centrifugó y se eliminaron 800 µl de sobrenadante. El resto, se sembró en placas de LB-agar con ampicilina. Cada placa contenía además 120 µl de X-gal (20mg/ml) y 40 µl de IPTG (100mg/ml). Las placas se incubaron a 37°C durante 20 horas. Se recogieron las colonias blancas (Figura. II.8) y se incubaron en 1 ml de LB-agar con ampicilina durante 15 horas a 37°C en agitación. Se recuperaron un total de 536 clones de los cuales se utilizaron 248 y el resto se guardaron como stock en LB-agar y glicerol.



**Figura II.8.** Placa de LB-agar con ampicilina, X-gal e IPTG, de la que se seleccionaron las colonias blancas, que contenían el plásmido recombinante (rodeadas en rojo).

### II.2.5.d. Extracción de plásmidos

Los plásmidos recombinantes se aislaron a partir de los 248 clones seleccionados utilizando el kit comercial QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), y los insertos se amplificaron usando los cebadores universales M13:

M13F: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'

M13R: 5' AACAGCTATGACCATG 3'



El producto de la PCR se visualizó en un gel de agarosa al 1% para comprobar que efectivamente el plásmido contenía el inserto y estimar el tamaño del mismo. Se seleccionaron para secuenciar 169 fragmentos superiores a 500 pares de bases para poder diseñar los cebadores (Figura II.9). La secuenciación fue realizada por un servicio de secuenciación comercial (MWG Biotech) con los cebadores M13 anteriormente mencionados. Mediante observación de los cromatogramas, se identificaron 114 clones que contenían motivos microsatélite (Figura II.10).

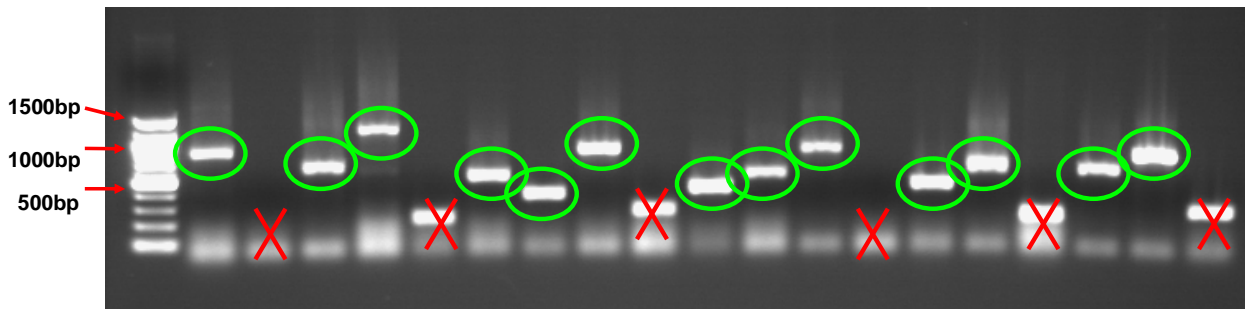
#### **II.2.6. Diseño de cebadores**

Se diseñaron cebadores con el programa genetool v. 1.0 (<http://www.doubletwist.com>) para 18 de las mejores secuencias con repeticiones obtenidas. Muchos de los clones tuvieron que ser desechados debido a la mala calidad de la parte final de su secuencia, o a la localización de las regiones repetidas al inicio de la misma, lo que imposibilitaba el diseño de cebadores (Figura II.11). Para los clones HEM114 y HEM155, se encontraron regiones con repeticiones GT interrumpidas. Los cebadores “Forward” se marcaron en su extremo 5’ con fluorocromos (Tabla II.1).

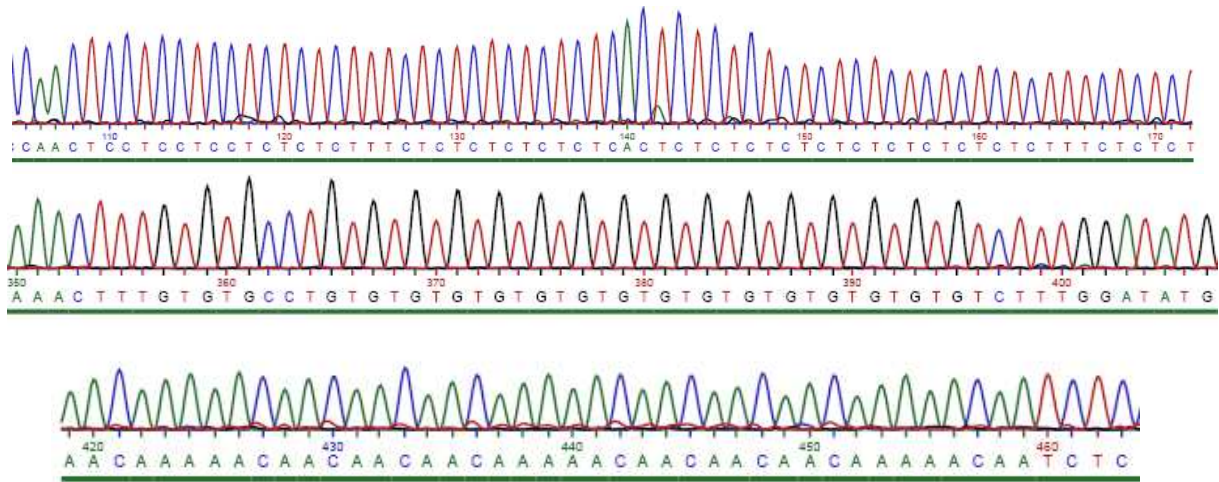
#### **II.2.7. Optimización de las condiciones de PCR y comprobación de la variabilidad de los marcadores**

Se optimizaron las condiciones de las reacciones de PCR, modificando las concentraciones de reactivos y los ciclos, hasta que se consiguió un patrón de uno o dos picos en cada microsatélite de acuerdo con la naturaleza diploide de *Hormogaster elisae*. Las condiciones para todos los loci se resumen en la Tabla II.2. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl con 5 ng de ADN genómico, 1X de tampón de PCR (Invitrogen) concentración de MgCl<sub>2</sub> específica para cada locus (Tabla II.2), 2 mM de dNTPs, 2 pM de cada cebador y 1 unidad de enzima Taq polimerasa (Invitrogen) en un termociclador Master Cycler EP Gradient (Eppendorf). Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5% y se analizaron en el secuenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante, mezclando 3 µl del producto de PCR con 12 µl de una mezcla de Formamida (1152 µl) con el marcador de tamaño Genescan Rox 500 (48 µl,

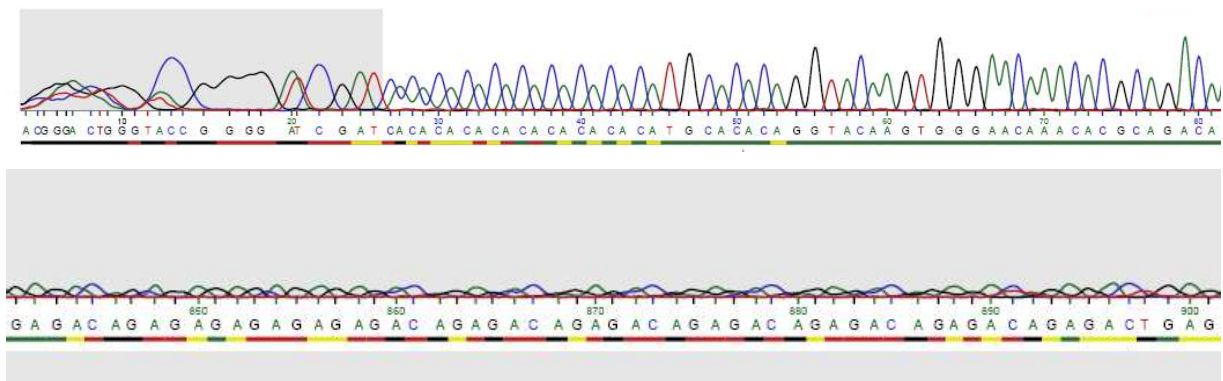
Applied Biosystems). Se identificó el tamaño de los productos de PCR usando el programa Genemapper 3.7 (Applied Biosystems).



**Figura II.9.** Gel de agarosa para comprobar el éxito de la clonación y el tamaño de los insertos. Se seleccionaron para secuenciar aquellos fragmentos mayores de 500 pares de bases aproximadamente (rodeados en verde).



**Figura II.10.** Cromatogramas de las secuencias obtenidas en tres fragmentos que contenían repeticiones.



**Figura. II.11.** Cromatogramas representando problemas que se encontraron para diseñar los cebadores. La región con repeticiones puede estar situada en la parte inicial de la secuencia (cromatograma superior) o la calidad de la secuencia puede ser mala en la parte final (cromatograma inferior). En ninguno de los casos es posible el diseño de cebadores.

Después se comprobó la utilidad de los diferentes loci como marcadores moleculares en 25 individuos procedentes de la misma población que el individuo elegido para el diseño de los cebadores, El Molar (Madrid, España). Se aisló el ADN genómico total a partir de 25 mg de tegumento de estos individuos, siguiendo las instrucciones del kit comercial DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) con dos eluciones de 70  $\mu$ l y 30  $\mu$ l, y añadiendo 4  $\mu$ l de ARNasa (10mg/ml). Las condiciones de PCR y lectura de fragmentos fueron las descritas anteriormente.

Se calcularon parámetros de genética de poblaciones usando el programa ARLEQUIN v. 2.0 (Schneider *et al.* 2000) y el Contenido de Información Polimórfica (Polimorphism Information Content, PIC) usando la herramienta online (<http://ibgwww.colorado.edu/~pshaun/gpc/mpic.html>, Purcell *et al.* 2003).

Se comprobó si existía desequilibrio de ligamiento usando el test exacto de Fisher en el programa GENEPOP v. 3.4 (Raymond y Rousset 1995) con los parámetros de cadena de Markov incluidos por defecto.

Diez loci microsatélite probaron ser altamente polimórficos e informativos. El análisis de desequilibrio por ligamiento arrojó dos casos significativos (HEM 07 vs. HEM 128,  $P=0,00007$ ; HEM 114 vs. HEM 193,  $P=0,0204$ ) entre las 45 comparaciones realizadas. Una de las comparaciones (HEM 07 vs. HEM 128) se mantuvo significativa incluso después de la corrección de Bonferroni (nivel crítico de significación de  $\alpha=0,0011$ ), indicando que los ocho loci restantes no estaban ligados. La proporción de fallo en la amplificación para los loci HEM 155, HEM 193, HEM 215 fue 0,19, 0,07 y 0,07 respectivamente, sugiere la presencia de alelos nulos. Se estudió el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) usando el algoritmo del test exacto de Fisher y las cadenas de Markov en el programa ARLEQUIN v. 2.0 (Schneider *et al.* 2000). Seis de los loci (HEM07, HEM114, HEM155, HEM 185, HEM188 y HEM193) mostraron grandes diferencias entre la heterocigosis observada y esperada (Tabla II.1). Hay varias razones posibles que justificarían esta falta de ajuste al HWE, entre ellas la presencia de alelos nulos y la subestructuración de la población y endogamia. Se ha visto que los individuos de *H. elisae* se mueven poco para buscar pareja (véase capítulo III), por lo que la endogamia podría explicar este desvío del HWE. En la Tabla II.1 se muestran más detalles de estos loci, tales como las repeticiones que contienen, secuencias de los

cebadores, características de los alelos, estimas de PIC y números de acceso en la base de datos GenBank.

Por último se hizo una prueba preliminar sobre la utilidad de estos cebadores en otras poblaciones de la especie de interés. Se utilizaron cuatro individuos de cada una de las poblaciones seleccionadas: Lozoyuela (N 40°56'51,9'' W 3°37'16,2''), Redueña (N 40°48'46,7'' W 3°36'06,2''), Pardo (N 40°31'11,0'' W 3°47'42,7'') en Madrid y Siguero (N 41°11'06,1'' W 3°37'07,4'') en Segovia. Los resultados de la prueba de amplificación se muestran en la Tabla II.3. Los cebadores funcionaron mejor para amplificar regiones microsatélite en las poblaciones de Lozoyuela y Redueña, y los peores resultados se dieron para las poblaciones de Siguero y, sobre todo, de El Pardo. En las dos primeras, el éxito de amplificación fue próximo al 100%, a pesar de que algunos loci no mostraron variabilidad y en otros había demasiado ruido en los patrones obtenidos en la lectura de fragmentos. En las segundas, además de estos problemas, el porcentaje de fallo en la amplificación fue mucho mayor. Para comprobar la variabilidad real, sería necesario analizar más individuos de las distintas poblaciones, ya que cuatro individuos no es un número suficiente para evaluar este aspecto. Esta prueba sólo tenía una intención exploratoria. En los loci que presentaban ruido en los patrones de lectura, sería necesario invertir más esfuerzo en optimizar las condiciones de la reacción de PCR, ya que los resultados son prometedores. Los resultados de esta prueba exploratoria están de acuerdo con el hecho de que los cebadores diseñados para amplificar regiones microsatélites son muy específicos y con los resultados de los capítulos IV y V, donde se muestra cómo Lozoyuela y Redueña tienen distancias genéticas mucho menores con el Molar y, sin embargo, Siguero y El Pardo podrían considerarse incluso especies distintas.

En conclusión, los marcadores desarrollados en este capítulo tienen el grado de polimorfismo y fiabilidad requerido para realizar análisis de paternidad y selección sexual en la población de El Molar. Serían necesarios más esfuerzos en el futuro para poder utilizarlos con éxito en otras poblaciones de *H. elisae*.

Locus	Repetición	Secuencia del cebador (5' - 3')	Fluorocromo <sup>a</sup>	Rango de tamaño (bp) <sup>b</sup>	N	NG	NA	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	PIC	Número de acceso GenBank
HEM07	(CT) <sub>26</sub> <sup>†</sup>	F:CTGTTCTCCGTGACTTCGAG R:CAGGGAGTCAGACAGGCAGT	FAM	136 - 192 (166)	26	20	19	0,69	0,92	0,90	AM902182
HEM114	(GT) <sub>69</sub> <sup>†</sup>	F:TGTGCCTGTGCGCCTGTGTG R:GGGGAGGAGGGATGGGACAAGAG	HEX	154 - 258 (186)	26	14	9	0,52	0,80	0,76	AM902183
HEM128	(GT) <sub>45</sub>	F:GCACAACTTCATAGCGCCATCGAC R:TCCCAATTGCTCGGCGCCATC	FAM	188 - 300 (188)	26	10	8	0,77	0,66	0,61	AM902184
HEM129	(GT) <sub>116</sub> <sup>†</sup>	F:CCATGCCATATCCTGCGTCCAACA R:AGAAATACTGTAGACACGCACACC	FAM	280 - 432 (426)	26	10	8	0,65	0,61	0,57	AM902185
HEM155	(GT) <sub>68</sub> <sup>†</sup>	F:TGTCCTCACCCCAACTACCATAAGC R:ACGACGGCGATGCAGCAAATATT	HEX	232 - 434 (302)	26	20	25	0,62	0,98	0,95	AM902186
HEM185	(CA) <sub>11</sub>	F:AAAGGACTTAAGCACTGACACTCGAACA R:CATCTTGATCCACAGTGTTGCCATATAC	FAM	94 - 192 (118)	26	15	12	0,92	0,88	0,85	AM902187
HEM188	(CT) <sub>24</sub>	F:CCGGGAGCCTCATGCAACAG R:CCGATAAACTCAGAAAAACGCATAAACT	FAM	200 - 310 (250)	26	20	16	0,58	0,93	0,90	AM902188
HEM193	(GT) <sub>43</sub> <sup>†</sup>	F:CAGTTATGTATGTGTTTTGCGTGGGTGTA R:CAAAGAGAGCTCCGCCAGTTACGTAGAC	FAM	130 - 156 (148)	26	12	8	0,33	0,79	0,72	AM902189
HEM194b	(GTCTCT) <sub>4</sub>	F:GCCCCATCCCCGCTTCTTTGTAT R:GCGCACCAAAATAAAGCCACACTAGTA	HEX	142 - 244 (154,160)	26	12	10	1,00	0,82	0,77	AM902190
HEM215	(CAA) <sub>16</sub> <sup>†</sup>	F:AGTTCGTGTATGTTTGTGCGTTCTTA R:GGGCGCTTAAGAAACCTGGAGA	FAM	180 - 348 (180)	26	16	10	0,70	0,82	1,00	AM902191

**Tabla II.1.** Detalles de los marcadores microsatélite desarrollados en este capítulo. <sup>a</sup> :Marcador fluorescente en el extremo 5' del cebador, <sup>b</sup> : Los números entre paréntesis representan el tamaño del alelo o alelos más frecuentes, bp: pares de bases, N: número de individuos analizados, NG : Número de genotipos obtenidos por locus, NA: número de alelos, H<sub>o</sub> : Heterocigosis observada, H<sub>e</sub> : Heterocigosis esperada, † : Estos microsatélites contienen interrupciones entre repeticiones.

Loci	Mg++	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Unión	Elongación	Elongación final	N. de ciclos
HEM07 HEM194b	1,5	94°C 60 seg	94°C 30 seg	60°C 15 seg	72°C 15 seg	72°C 3 min	30
HEM114 HEM129 HEM185	2,5	94°C 15 min	94°C 30 seg	55°C 90 seg	72°C 60 seg	60°C 30 min	35
HEM155 HEM128 HEM188 HEM193 HEM215	2,5 1,5	94°C 15 min 94°C 5 min	94°C 30 seg 94°C 60 seg	57°C 90 seg 60°C 60 seg	72°C 60 seg 72°C 60 seg	60°C 30 min 72°C 7 min	35

**Tabla II.2.** Parámetros para la amplificación de los diferentes loci. Mg++: Concentración de Magnesio en mM utilizada para la amplificación.

Locus	Lozoyuela	Pardo	Redueña	Siguero
HEM07	+ 2,5mM Mg++	-	+ 2,5mM Mg++	-
HEM114	+	+	+	+
	¿Poco variable?	Mucho ruido	¿Poco variable?	Mucho ruido
HEM128	+	+	+	+
HEM129	+	-	+	+
	Ruido		Ruido	Ruido
HEM155	No	-	-	-
HEM185	+	+	+	+
	¿Poco variable?	¿Poco variable?	¿Poco variable?	¿Poco variable?
HEM188	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++
	¿Poco variable?	¿Poco variable?	¿Poco variable?	¿Poco variable?
HEM193	+ 2,5mM Mg++	-	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++
HEM194b	+	-	+	-
HEM215	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++	+ 2,5mM Mg++
	Ruido	Ruido	Ruido	Ruido

**Tabla II.3.** Prueba orientativa de amplificación en individuos de otras poblaciones de *Hormogaster elisae* con las condiciones con las que se estandarizaron los cebadores. Se indica en cada caso si la amplificación fue exitosa (+) o fallida (-). En algunos casos los resultados mejoraron al aumentar la concentración de Magnesio a 2,5 mM. La expresión “¿Poco variable?” quiere decir que para los cuatro individuos analizados en esa población los alelos eran los mismos. La expresión “Ruido” o “Mucho ruido” indica que sería necesario un mayor esfuerzo de optimización de las condiciones para ese locus concreto en esa población.



**III. Selección de pareja de *Hormogaster elisae* en una parcela  
de El Molar (Madrid)**





### III. Selección de pareja de *Hormogaster elisae* en una parcela de El Molar (Madrid)

(Publicación Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Gutiérrez M, Díaz Cosín DJ. Mate choice of an endogeic earthworm revealed by microsatellite markers. Aceptada en Pedobiología.)

#### RESUMEN

Las lombrices de tierra endogeas son animales de difícil estudio debido al medio críptico en el que viven. Así, hasta el momento, los esfuerzos de los investigadores se han centrado principalmente en el estudio del comportamiento de lombrices de tierra epigeas y anécicas. En este capítulo se utilizan marcadores microsatélite como herramienta para dilucidar procesos de selección sexual en *Hormogaster elisae*, una especie de lombriz de tierra endogea. Se ha observado que los individuos de esta especie copulan generalmente con dos parejas, preferentemente del mismo tamaño, que encuentran en las cercanías, sin necesidad de desplazarse demasiado. Los análisis genéticos del espermatozoides contenido en cada una de sus cuatro espermatecas mostraron una distribución uniforme del mismo, sin almacenamiento diferencial del espermatozoides procedente de diferentes individuos.

#### ABSTRACT

Endogeic earthworms are difficult study subjects due to the cryptic medium in which they live. Thus, only the behaviour of epigeic and anecic earthworms has been studied before. We used microsatellite markers as a tool to elucidate the sexual selection processes of *Hormogaster elisae*, an endogeic earthworm. It was shown to mate generally with two partners, preferably of the same size, that it finds in the neighbourhood, with no need for long-distance dispersion. The genetic analyses of the sperm within each of its four spermathecae showed a uniform distribution with no signs of differential storage of sperm from different partners.

### III.1. Introducción

La selección sexual y el comportamiento de apareamiento se han estudiado en lombrices epigeas (*Eisenia fetida* por Monroy *et al.* 2005, *Eisenia andrei* por Tato *et al.* 2006) y anécicas (*Lumbricus terrestris* por Nuutinen y Butt 1997, Butt y Nuutinen 1998, Michiels *et al.* 2001, Sahm *et al.* 2009), pero no se ha prestado atención a las lombrices de tierra endogeas, cuyos ciclos biológicos y estrategias vitales exhiben diferencias sustanciales. Las lombrices de tierra endogeas, viven en las capas más profundas del suelo, raramente alcanzando la superficie (Valle *et al.* 1999), lo que hace que sea extremadamente difícil su observación directa y como consecuencia el estudio de su comportamiento. Sin embargo, es esperable que las lombrices de tierra endogeas tengan su propia estrategia reproductiva ya que sus ciclos de vida son mucho más largos y las tasas de producción de capullos son menores en relación con otras lombrices de otras categorías ecológicas (Edwards y Bohlen 1996, Díaz Cosín *et al.* 2009). Por tanto, el estudio de su comportamiento de apareamiento y selección sexual puede ser muy interesante.

*Hormogaster elisae* es un buen ejemplo de lombriz de tierra endogea. Se trata de una especie hermafrodita simultánea de fecundación cruzada, endémica de la Península Ibérica, que podría representar un complejo de especies crípticas (véase capítulo V de esta memoria). *H. elisae* necesita como media unos 484 días para desarrollar el clitelo y su tasa de producción de capullos se encuentra en el rango de 0,9 a 2,29 capullos por lombriz y año (Díaz Cosín *et al.* 2009).

Debido a la crípsis del medio en el que viven las lombrices endogeas, el análisis de marcadores moleculares, como los microsatélites, es una buena manera para desentrañar algunos de los aspectos de su reproducción y comportamiento. Este tipo de marcadores han sido utilizados recientemente por Sahm *et al.* (2009) para estudiar las preferencias de apareamiento en *L. terrestris* y en este momento disponemos de cebadores específicos para la especie *H. elisae* (capítulo II de esta memoria).

En este capítulo se abordan varios aspectos sobre los mecanismos de selección sexual previa a la cópula, como por ejemplo cual es el número de parejas, si las

lombrices eligen a sus parejas en función de su tamaño o si el éxito de apareamiento depende de la talla o la variabilidad genética. En la Figura III.1 se pueden observar individuos de *H. elisae* copulando. Esta es la única pareja que se ha encontrado durante los muestreos realizados en esta Tesis, que fueron muchos, lo que confirma la dificultad para observar este fenómeno.

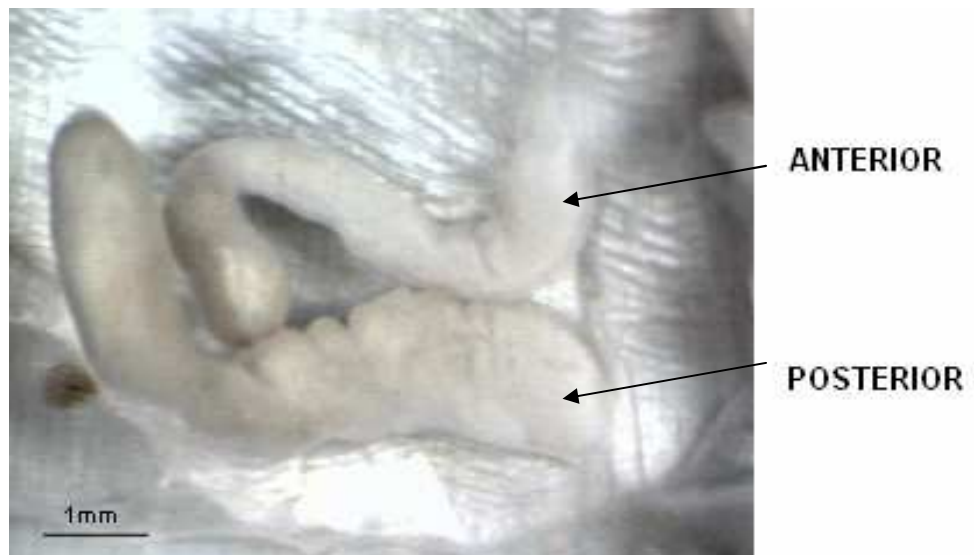
Una estrategia diferente de selección sexual, podría darse después de la cópula (Birkhead y Pizzari 2002), cuando existe cópula múltiple (es decir, con diferentes parejas). Esta selección posterior a la cópula puede ser por competencia espermática (Parker 1970) o selección femenina críptica (“cryptic female choice”) (Thornhill 1983). Dos de los posibles mecanismos de selección femenina críptica en lombrices de tierra son la digestión del espermatozoides antiguo (Richards y Fleming 1982) o el almacenamiento diferencial del mismo dentro de las espermatecas (compartimentación). Hemos estudiado esta segunda hipótesis en *H. elisae*, que tiene dos pares de espermatecas tubulares y grandes, localizadas en los intersegmentos 9/10 y 10/11. Hemos observado a lo largo de los años que, en muchas ocasiones, el par posterior de espermatecas contiene más espermatozoides que el par anterior (Garvín *et al.* 2003, Figura III.2) Otras especies de hormogástridos presentan espermatecas mucho menores en comparación con su tamaño y, en algunos casos, cámaras diferentes dentro de cada espermateca (Qiu y Bouché 1998, véase Figura I.12). Dado que *H. elisae* no tiene subdivisiones tisulares dentro de la espermateca, nuestra hipótesis es que los individuos de esta especie podrían usar las distintas espermatecas para almacenar el espermatozoides de parejas distintas, ejerciendo éstas así, una función equivalente a la que podrían ejercer las diferentes cámaras que presentan otros hormogástridos dentro de una espermateca.

No hay información acerca de los movimientos de los individuos de *H. elisae* bajo el suelo, y no se sabe si se mueven para buscar a un compañero de cópula o si se quedan más o menos fijos en un territorio determinado. Este último comportamiento se observó en la lombriz de tierra anécica *L. terrestris*, de la cual se sabe que permanece anclada a su galería (Michiels *et al.* 2001). Sin embargo, el sistema de galerías de *H. elisae* es posiblemente más complejo, ya que las lombrices de tierra endogeas normalmente construyen sistemas de galerías semipermanentes o temporales. Mediante el muestreo de diferentes puntos dentro de una parcela se intenta inferir en este capítulo

la capacidad de movimiento de *H. elisae* para buscar pareja y detectar su estructura genética a una escala microgeográfica.



**Figura III.1.** Individuos de *Hormogaster elisae* copulando. En uno de ellos se pueden observar restos del esperma transferido. Esta es la única ocasión en la que se pudo observar este fenómeno durante la presente Tesis a pesar de la cantidad de muestreos realizados, lo que indica la dificultad de su estudio.



**Figura III.2.** Detalle de un par de espermatecas de *Hormogaster elisae*. Se observa la iridiscencia del esperma en el interior de las mismas. Obsérvese el mayor tamaño de la espermateca posterior.

## III.2. Materiales y métodos

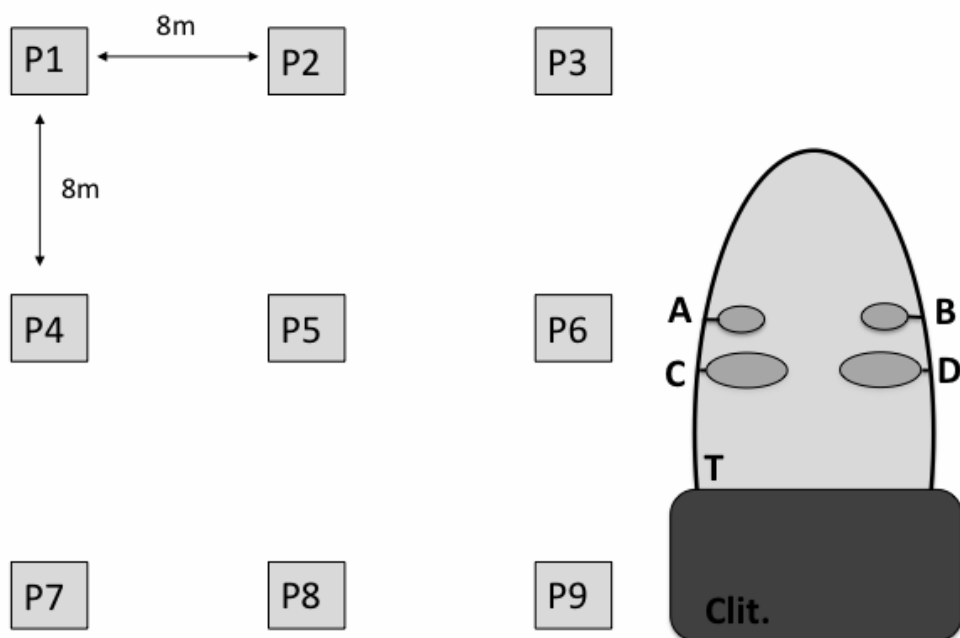
### III.2.1. Muestreo y disección de lombrices

Se recogieron un total de 75 individuos clitelados de *Hormogaster elisae* mediante muestreo por excavación y separación manual en El Molar (Madrid, España: N40°44'22,9'' W3°33'53,1'', Figura III.3) en enero de 2008. Se puede ver su localización en los mapas de las Figuras IV.2 y V.1. Las condiciones climáticas y edáficas y vegetación del lugar de muestreo están descritas con detalle en Valle *et al.* (1997), Gutiérrez *et al.* (2006) y Hernández (2005). En la Tabla V.4 están indicadas las propiedades del suelo de esta parcela. El diseño de muestreo se muestra en la Figura III.4. Las lombrices de tierra se capturaron en nueve cuadrículas diferentes con un área aproximada de 1m<sup>2</sup>, cada una separada 8 m de la contigua, formando así un área de 64 m<sup>2</sup>. Se capturaron de seis a diez individuos en cada cuadrícula (Tabla III.3), que es una densidad relativamente alta que podría permitir cierta selección entre diferentes parejas.



**Figura III.3.** Parcela en la que se ha realizado el estudio en El Molar (Madrid, España).

Los individuos capturados se lavaron cuidadosamente con agua destilada y a continuación se fijaron en etanol absoluto, en el que se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente se procedió a la disección de los ejemplares bajo la lupa y se tomaron cinco muestras diferentes de cada uno de ellos: se separó una porción de 0,025 g del tegumento (T, Figura III.4) y se aislaron las cuatro espermatecas (A-D, Figura III.4), resultando un total de 375 muestras.



**Figura III.4.** Diseño de muestreo (izquierda) y muestras de ADN (derecha) tomadas de las lombrices de tierra recogidas: A-D representan las espermatecas, localizadas en los intersegmentos 9/10 y 10/11 y T representa el tegumento. El clitelo se localiza en los segmentos 14-27 (Clit.). Pn: cuadrículas de  $1\text{ m}^2$  en las que se tomaron las muestras.

### III.2.2. Análisis de fragmentos microsatélites

Se aisló el ADN del tegumento y de cada una de las cuatro espermatecas usando el kit de extracción DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) y se almacenó a 4°C. Se seleccionaron cuatro loci (Tabla III.1) con alto polimorfismo entre los marcadores microsatélite desarrollados para *H. elisae* en el capítulo II de esta memoria. Las reacciones de PCR contenían un volumen de 20 µl con 5 ng de ADN, una concentración 1X de tampón de PCR (Biotools), concentración de MgCl<sub>2</sub> específica para cada locus (Tabla III.1), 1 mM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador (0,25 µM en el caso de HEM 194b) y 1 unidad de enzima Taq polimerasa (Biotools) en un termociclador Perkin Elmer 9700. El perfil de la PCR fue 94°C (1 minuto), 30 ciclos de [94°C (30 segundos), 60°C (15 segundos), 72°C (15 segundos)] y una extensión final de 3 minutos a 72°C. Para el locus HEM193, el perfil de la PCR fue 94°C (5 minutos), 35 ciclos de [94°C (1 minuto), 60°C (1 minuto), 72°C (1 minuto)] y una extensión final de 7 minutos a 72°C. Se verificó el buen funcionamiento de la PCR en un gel de agarosa al 1% y a continuación se analizaron los fragmentos en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Servicio Central de la UCM). Se identificó el tamaño de los alelos mediante el marcador estándar de tamaño *GS-500 LIZ* y el programa PEAK SCANNER v. 1.0 (Applied Biosystems).

Locus	Repetición	Secuencia del cebador (5' - 3')	Mg++	Fluorocromo*	Número de acceso GenBank
HEM07	(CT) <sub>26</sub> †	F:CTGTTCTCCGTGACTTCGAG R:CAGGGAGTCAGACAGGCAGT	2,5	FAM	AM902182
HEM194b	(GTCTCT) <sub>4</sub>	F:GCCCCATCCCCGCTTCTTTGTAT R:GCGCACCAAAATAAAGCCACACTAGTA	2,5	VIC	AM902190
HEM188	(CT) <sub>24</sub>	F:CCGGGAGCCTCATGCAACAG R:CCGATAAACTCAGAAAAACGCATAAACT	1,5	VIC	AM902188
HEM193	(GT) <sub>43</sub> †	F:CAGTTATGTATGTGTTTTGCGTGGGTGTA R:CAAAGAGAGCTCCGCCAGTTACGTAGAC	3	FAM	AM902189

**Tabla III.1.** Detalles de los marcadores microsatélite utilizados en este estudio. †: Estos microsatélites contienen interrupciones entre repeticiones, Mg++: Concentración de Magnesio en mM utilizada para la amplificación, \*: Marcador fluorescente en el extremo 5' del cebador.



### III.2.3. Análisis genético a nivel microgeográfico

Se utilizó el programa ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para obtener los resultados sobre la diversidad genética global a partir de las muestras de tegumento. Se calculó para cada locus el número de alelos (NA) y la heterocigosis observada (Ho) y esperada (He). Se comprobó la adecuación al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) siguiendo el procedimiento descrito en Guo y Thompson (1992) y se hicieron pruebas de desequilibrio de ligamiento siguiendo a Slatkin (1994). Se calculó el Contenido de Información Polimórfica (Polymorphism Information Content, PIC) usando EXCEL MICROSATELLITE TOOLKIT (Park 2001).

Se utilizó el programa FSTAT v. 2.9.3 (Goudet 2001) para calcular la variación genética dentro de cada punto de muestreo, incluyendo heterocigosis esperada media (He) y riqueza alélica (A). Para esta última, FSTAT estima el número de alelos en una muestra corregido para el menor tamaño de muestra, como recomiendan El Mousadik y Petit (1996). Se estudió la posible existencia de estructura genética dentro del área estudiada, mediante un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992), implementado en el programa ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Se calcularon parámetros del estadístico F de Weir y Cockerham (1984): valores de Fst por pares (como estimas de la diferenciación genética entre puntos de muestreo) y valores de Fis (coeficientes de endogamia dentro de los puntos de muestreo).

Se estudió la existencia de un patrón de aislamiento por distancia con el test de Mantel (1967), que correlaciona la matriz de distancia genética entre puntos de muestreo (Fst) con la distancia geográfica (línea recta entre puntos de muestreo). La significación de la correlación entre las matrices se evaluó con 10.000 permutaciones aleatorias en el programa ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005).

### III.2.4. Análisis de selección de pareja

El tamaño de los alelos de cada espermateca se determinó por separado para estudiar si existía un patrón de almacenamiento diferencial en las cuatro espermatecas. Los alelos coincidentes con aquellos de las muestras de tejido del individuo focal se

eliminaron de los análisis ya que las paredes de las espermatecas estaban incluidas en la extracción de ADN. Posteriormente todos los alelos de las cuatro espermatecas se combinaron para calcular el número mínimo de parejas que había tenido cada individuo. Para esta estima se consideró el locus que contenía mayor número de alelos y ese número se dividió entre dos, ya que *H. elisae* es diploide.

Las probabilidades de apareamiento se calcularon siguiendo a Sahm *et al.* (2009). Para cada individuo de un punto de muestreo dado, se calculó la probabilidad de haber recibido esperma de todos los demás individuos de ese punto. Para ello, se estudió la presencia (1)/ausencia (0) de los alelos del tegumento de los donantes potenciales en el ADN de la espermateca del individuo focal o receptor. La probabilidad de que un alelo hubiera sido donado se corrigió restando a la presencia en su caso (1), la frecuencia de ese alelo en la población (Probabilidad=1- Frecuencia alélica). Así se aumenta la probabilidad en el caso de que un alelo sea raro y se disminuye en el caso de que un alelo sea más frecuente en la población. Por último se hizo la media de la probabilidad de que los dos alelos fueran donados. Esta probabilidad se calculó para cada locus y luego se hizo una media entre los cuatro loci.

La probabilidad de apareamiento de dos individuos se calculó como la media entre las probabilidades de que un individuo recibiera esperma de otro y viceversa. El éxito de apareamiento de cada individuo se estimó y expresó como la probabilidad global de que ese individuo de donar y recibir esperma y como la probabilidad de copular (el valor medio de las dos anteriores).

Se llevaron a cabo análisis de correlación en el programa STATISTICA v. 6.1 (StatSoft, Inc. (2001), <http://www.statsoft.com>). Se estudió en primer lugar la correlación de las probabilidades de apareamiento entre los individuos con las diferencias en tamaño de estos (expresado como peso). Además, se exploró la correlación entre las probabilidades globales de éxito de apareamiento (donación y recepción de esperma y cópula) y el peso de los individuos. Se llevo a cabo un ANOVA para explorar la posibilidad de que las probabilidades de apareamiento de los individuos dependiera de su grado de heterocigosis (el número de loci heterocigotos representaba las categorías). Este análisis se realizó utilizando el peso de los individuos como covariante.

### III.3. Resultados

#### III.3.1. Análisis genético microgeográfico

Los valores de diversidad genética total para cada locus microsatélite se muestran en la Tabla III.2. Los loci mostraron alto polimorfismo y el número de alelos estuvo en el rango de 12 a 24. La heterocigosis observada varió desde 0,41 a 0,91 y el contenido de información polimórfica resultó tener valores entre 0,80 y 0,93. Se encontraron diferencias entre los valores de heterocigosis esperada y observada, es decir, no se encontró ajuste con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

Locus	Rango de tamaño (pb)*	N	NA	Ho	He	HWE P-valor	PIC
HEM07	134-202 (156,164)	75	24	0,89	0,94	0,0000	0,93
HEM194b	154-244 (154)	75	12	0,91	0,83	0,0022	0,80
HEM188	222-310 (256)	75	20	0,41	0,91	0,0000	0,90
HEM193	124-178 (148)	75	17	0,67	0,88	0,0000	0,86

**Tabla III.2.** Diversidad genética global para cada locus. \* Los números entre paréntesis indican el tamaño de alelo más frecuente (en pares de bases, pb). N: Número de individuos analizados; NA: Número de alelos; Ho: Heterocigosis observada; He: Heterocigosis esperada; HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg; PIC: Contenido de Información Polimórfica.

Los análisis de desequilibrio de ligamiento identificaron dos casos significativos (HEM07 vs. HEM188,  $P = 0,031$ ; HEM188 vs. HEM193,  $P = 0,017$ ) de entre las seis comparaciones por pares. Ninguno de estos casos permanecieron significativos tras la corrección de Bonferroni (nivel crítico de significación de  $\alpha=0,008$ ), indicando que los loci usados no están ligados.

En la Tabla III.3 se muestra la variabilidad genética dentro de cada punto de muestreo y los valores de Fis. Los coeficientes de endogamia fueron todos positivos y variaron desde 0,096 hasta 0,234. No se detectó una estructura genética significativa

(Tabla III.4) en el área estudiada y la diferenciación entre puntos de muestreo explicó sólo el 3,14% de la variación genética encontrada, que se explicaba sobre todo por diferencias entre y dentro de individuos. Los valores de  $F_{st}$  por pares estuvieron en un rango de -0,01049 a 0,10343, exhibiendo diferenciación genética moderada (Tabla III.5).

Punto de muestreo	N	A	He	Fis
P1	7	6,55	0,87	0,189*
P2	6	6,50	0,85	0,234*
P3	9	7,13	0,89	0,161*
P4	9	5,76	0,78	0,121
P5	8	6,68	0,88	0,195*
P6	10	6,05	0,84	0,174*
P7	10	6,43	0,87	0,173*
P8	8	7,16	0,87	0,185*
P9	8	6,63	0,86	0,096
<b>Total</b>	<b>75</b>	<b>7,32</b>	<b>0,89</b>	<b>0,191</b>

**Tabla III.3.** Variabilidad genética media y coeficientes de endogamia dentro de cada punto de muestreo en los cuatro loci microsatélites. N: Número de individuos analizados; A: Riqueza alélica media; He: Heterocigosis esperada media. Los asteriscos en Fis representan coeficientes significativos al  $P < 0,05$ .

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Índices de fijación	P-valores	Porcentajes de variación
Entre puntos	8	23,61	0,056	0,031 (FST)	0,76	3,14
Entre individuos dentro de puntos	66	133,31	0,290	0,168 (FIS)	0,00	16,23
Dentro de individuos	75	108,00	1,440	0,193 (FIT)	0,00	80,63

**Tabla III.4.** Resultados del AMOVA en *Hormogaster elisae* basados en los loci microsatélite. Se muestra la partición de la varianza a tres niveles jerárquicos. Se dan los índices de fijación (Weir y Cockerham 1984) correspondientes. gl: grados de libertad.

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
P1	-							
P2	0,05532	-						
P3	0,07034*	0,02812	-					
P4	0,02113	0,10343*	0,09370	-				
P5	0,02027	0,02211	0,02609	0,04499*	-			
P6	0,06941*	0,05501*	0,02140	0,09478*	0,03096	-		
P7	0,02947	0,03361	0,04114*	0,04915*	0,02298	0,03029	-	
P8	0,05222*	0,02526	0,03913	0,08298*	0,00657	-0,01049	0,02871	-
P9	0,06820*	0,00164	0,02461	0,09595*	0,01037	0,02564	0,04721*	0,01520

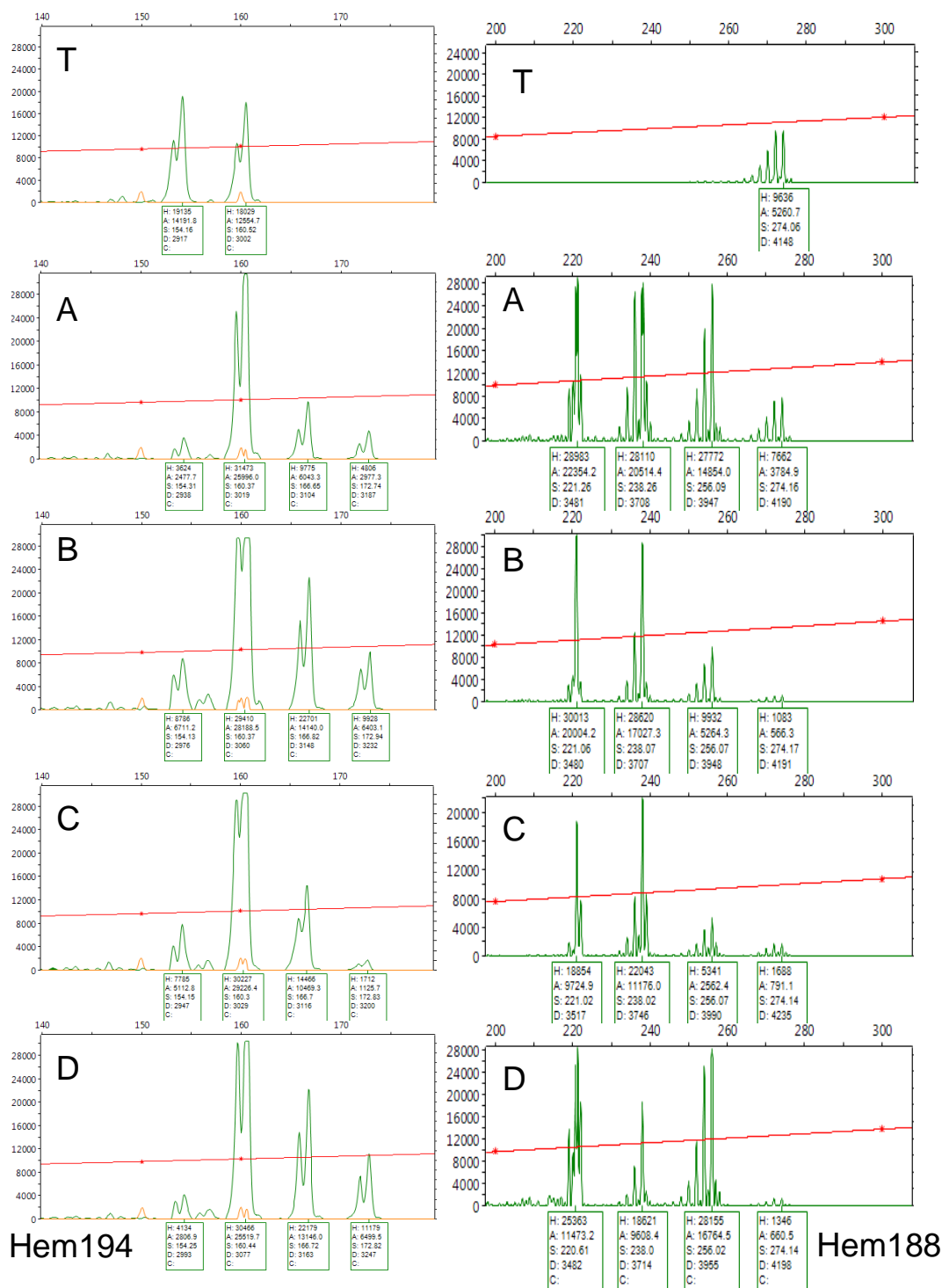
**Tabla III.5.** Valores medios de Fst por pares entre puntos de muestreo basados en los cuatro loci microsatélites. Los asteriscos representan valores significativos de Fst al  $P < 0,05$ .

El test de Mantel indicó que las distancias genéticas por pares entre puntos de muestreo (Fst) y la distancia entre puntos en metros están significativamente correlacionadas ( $P = 0,03$ ,  $r = 0,34$ ).

### III.3.2. Análisis de selección de pareja

La mayoría de los individuos (62,66%) tenían almacenado el esperma de un mínimo de dos parejas, mientras que el 18,67% de las lombrices habían copulado por lo menos con una pareja y las restantes (18,67%) tenían esperma de un mínimo de tres individuos diferentes.

No se encontraron diferencias en el patrón de almacenamiento de las cuatro espermatecas y se encontraron generalmente los mismos alelos en todas las espermatecas del mismo individuo. En la Figura III.5 se muestran ejemplos de este resultado, donde se observan los patrones de microsatélites de las muestras procedentes de dos individuos. Uno de ellos (columna izquierda) parece haber copulado con al menos una pareja y el otro (columna derecha) parece haber copulado con al menos dos parejas.



**Figura III.5.** Perfiles de los microsatélites de las cinco muestras analizadas (tegumento, T y cuatro espermatecas, A-D) tomadas de dos individuos diferentes (cada uno en una columna) y en dos loci diferentes (HEM194 a la izquierda y HEM188 a la derecha). El nombre de las muestras está de acuerdo a la Figura III.4. Cada pico representa un alelo distinto y en el eje superior de los perfiles se indica el tamaño de los fragmentos (debajo de cada pico se muestra su tamaño específico, S). El individuo representado en la columna izquierda (heterocigoto) muestra cuatro alelos en sus espermatecas. Eliminando los alelos presentes en su tejido, se podría decir que ha copulado con al menos una lombriz. El individuo representado en la columna de la derecha (homocigoto), presenta también cuatro alelos en sus espermatecas pero en este caso, eliminando el alelo perteneciente a su propio tejido, se podría decir que ha copulado con al menos dos lombrices, ya que quedarían tres alelos.

Se encontró una correlación negativa y significativa entre la probabilidad de apareamiento y la diferencia en peso de los individuos ( $r = -0,22$ ,  $P < 0,05$ ), indicando así que los especímenes prefieren copular con parejas con tamaño similar al suyo. No se encontraron resultados significativos en el resto de análisis estadísticos.

### III.4. Discusión

#### III.4.1. Análisis genético microgeográfico

Los valores de diversidad genética global fueron altos, similares a los que encontraron Velavan *et al.* (2009) e incluso mayores en cuanto a riqueza alélica. Se detectó una falta de ajuste al equilibrio de Hardy-Weinberg, igual que en los análisis del capítulo II. La hipótesis para explicar esta falta de ajuste era una posible estructuración dentro de la población (efecto Wahlund) que podría provocar endogamia. Efectivamente, los valores positivos de  $F_{IS}$  indican endogamia moderada dentro de los puntos de muestreo, pero que no resulta muy pronunciada, permitiendo así el mantenimiento de una alta diversidad genética. Los resultados del AMOVA indicaron ausencia de subestructura genética pero el resultado significativo del test de Mantel reveló un ligero patrón de aislamiento por distancia. Así, parece que los individuos de *H. elisae* no se mueven largas distancias para encontrar un compañero de cópula a pesar de que no haya estructuración pronunciada. Sahm *et al.* (2009) demostraron que la distancia era el factor más importante para la selección de pareja en *L. terrestris*, pero debido a la naturaleza endogea de *H. elisae*, ésta no está anclada a galerías verticales y no copula en superficie, por lo que no se predice necesariamente este mismo patrón. Los individuos de *H. elisae* no se exponen a los depredadores durante la cópula y por ello pueden moverse bajo el suelo para buscar compañeros adecuados. Sin embargo, estos resultados podrían indicar que los ejemplares de *H. elisae* están de alguna forma relacionados a sus galerías horizontales o que, debido a la alta densidad de individuos en el área estudiada (véase Tabla III.3), no precisan moverse largas distancias para encontrar una pareja. Esta escasa capacidad de movimiento se ha encontrado también en otras especies de lombrices de tierra con tasas observadas de dispersión de sólo 1,4–9 m/año (Ligthart y Peek 1997, Hale *et al.* 2005) y podría explicar el profundo

aislamiento genético entre poblaciones encontrado en los capítulos IV y V de esta memoria que ha sido causa de especiación críptica.

#### III.4.2. Selección de pareja

Los individuos de *H. elisae* copulan con una media de dos compañeros. Sin embargo, este hecho podría representar sólo su historia de apareamiento más reciente en el caso de que sólo se mantuviera en las espermatecas el esperma de las últimas parejas para un futuro uso. De hecho, un estudio histológico de las espermatecas de *H. elisae* (véase Figura I.11) ha mostrado que en las áreas centrales de éstas hay zonas que podrían ser interpretadas como esperma en degradación. Richards y Fleming (1982) encontraron fagocitosis de espermatozoides en las espermatecas de *Dendrobaena subrubicunda* y de otros lumbrícidos que probablemente se relacionaba con eliminación de esperma antiguo o aberrante durante los meses en los que la producción de capullos era mínima. Butt y Nuutinen (1998) observaron que *L. terrestris* era capaz de mantener, con éxito, el esperma recibido hasta seis meses y Meyer y Bowman (1994) vieron que *E. fetida* continuaba produciendo capullos hasta doce meses después de que las lombrices fueran aisladas de sus compañeros, aunque no se midió la viabilidad.

No se encontraron diferencias en el patrón de almacenamiento entre las cuatro espermatecas, lo que indica que si existiese selección posterior a la cópula en estos animales, ésta tendría que deberse a mecanismos dentro de cada espermateca. Grove y Cowley (1926) observaron que la transmisión de esperma en *E. fetida* normalmente ocurre en ambos lados del individuo, mientras que en *L. terrestris* se encontraron algunos individuos con espermátóforos en sólo un lado de sus cuerpos (Butt y Nuutinen 1998). Serán necesarios futuros estudios histoquímicos de ultraestructura y más estudios genéticos para desvelar estos mecanismos.

Se identificó una correlación negativa entre las diferencias de peso entre individuos y sus probabilidades de apareamiento, lo que significa que *H. elisae* selecciona parejas con peso similar. Este tipo de selección fue discutida ya por Michiels *et al.* (2001) que observaron en experimentos de laboratorio que las parejas de *L. terrestris* de tamaño similar copulaban antes que aquellas con tamaños diferentes. Monroy *et al.* (2005) también estudiaron este tipo de selección en *E. fetida*, que mostró



selección por tamaño en el campo, donde los individuos preferían a compañeros de talla similar. Esta selección podría explicarse en lombrices de tierra epigeas y anécicas como un compromiso entre elegir un compañero de cópula mayor, ya que la fecundidad (medida como peso de los capullos y tamaño de puesta) está relacionada con el tamaño corporal (Michiels *et al.* 2001), y elegir un compañero de menor tamaño que disminuiría el riesgo de depredación. Sin embargo, ya que *H. elisae* por su naturaleza endogea copula bajo tierra, se esperaría que seleccionara compañeros de mayor tamaño. La propuesta de que el apareamiento podría estar constreñido por incompatibilidad física de la cópula entre individuos de tamaños diferentes (Michiels *et al.* 2001) podría explicar esta selección de tamaños similares en *H. elisae*, aunque esta incompatibilidad posiblemente sólo se produciría en el caso de diferencias de tamaño muy exageradas. Por lo tanto, es más plausible que este patrón sea causado por el conflicto de la búsqueda de un compañero mayor por parte de todas las lombrices que finalmente llega a un equilibrio de compañeros de peso similar, compensando así las expectativas de ambos individuos en cuanto a las funciones masculina y femenina.

En experimentos de laboratorio que se han realizado (no publicados), hemos observado que los individuos vírgenes no muestran esta selección de tamaño, aunque los individuos más grandes siempre consiguen copular. Quizás esto se debe a que cuando no han copulado todavía no hay selección, ya que su interés primordial es recibir y donar espermatozoides, aunque los individuos más grandes sean siempre más “atractivos” debido a su mayor fertilidad. Será necesario un estudio más exhaustivo para profundizar en este aspecto, ya que estos resultados son fruto de observaciones preliminares.

#### **III.4.3. Conclusiones**

Esta es la primera vez que se estudia el comportamiento sexual en una lombriz de tierra endogea. A partir de los resultados de este estudio surgen nuevas preguntas, pero como conclusiones generales se puede decir que *H. elisae* copula con varias parejas, manteniendo espermatozoides de una media de dos individuos mezclado en sus cuatro espermatecas. Prefiere copular con compañeros de talla similar, al menos después de su primera cópula, que encuentra en las cercanías, sin necesidad de desplazarse demasiado.

#### **IV. Estudio de la variabilidad genética de *Hormogaster elisae***



## IV. Estudio de la variabilidad genética de *Hormogaster elisae*

(Publicación: Novo M, Almodóvar A, Díaz Cosín DJ (2009). High genetic divergence of hormogastrid earthworms (Annelida, Oligochaeta) in the central Iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications. *Zoologica Scripta*, 38 (5): 537–552)

### RESUMEN

Las lombrices de la Familia Hormogastridae desempeñan un papel muy importante para el funcionamiento del suelo en los países mediterráneos, pero hasta el momento, se sabe muy poco sobre la distribución de sus especies y su diversidad genética. En el presente capítulo, se han estudiado la diferenciación genética y el flujo génico entre diferentes poblaciones de hormogástridos del centro de la Península Ibérica. Se secuenció un fragmento de 648 pares de bases del gen que codifica la subunidad I de la enzima citocromo C oxidasa (COI), localizado en el ADN mitocondrial. Se estudiaron 82 individuos procedentes de siete localidades, resultando en 38 haplotipos exclusivos de localidad. Todos los individuos fueron identificados morfológicamente como *Hormogaster elisae* pero la alta divergencia encontrada entre poblaciones (hasta un 20,20%) sugiere la presencia de más de una especie críptica en esta región. Por ello, se estudiaron las relaciones filogenéticas y los análisis mostraron seis linajes evolutivos diferentes, coincidentes con su localización geográfica, incluyendo las poblaciones de Redueña y El Molar como una única unidad evolutiva. A partir de estos resultados, podrían definirse al menos tres especies más, además de la morfoespecie *H. elisae* s.s. El estudio de la varianza genética mostró la existencia de una estructura poblacional debida al aislamiento por distancia. Los datos sugieren que los linajes de *H. elisae* s.l. se originaron entre el Mioceno tardío y el Pleistoceno temprano, pero que sus genealogías de ADN mitocondrial coalescen a una escala más reciente del rango de pocos miles de años.

## ABSTRACT

Hormogastridae earthworms are highly important for the functioning of the Mediterranean soil system. However, little is known about the species distribution and genetic diversity of these soil invertebrates. In the present study, the genetic differentiation and gene flow were studied among populations of hormogastrids from the central Iberian Peninsula. A 648-bp portion of the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene (COI) was sequenced for 82 individuals from seven localities, resulting in the identification of 38 haplotypes exclusive to localities. All of the individuals were morphologically identified as *Hormogaster elisae*, but the high genetic divergence found among populations (up to 20.20%) suggests the occurrence of more than one cryptic species within this region. Further analysis of the phylogenetic relationships revealed six different evolutionary lineages coincident with geographical location, including the two nearest populations, El Molar and Redueña as one evolutionary unit. From these results, at least three new species could be inferred, in addition to the morphospecies *H. elisae* s.s. Partitioning of genetic variance among populations indicated that isolation by distance was the primary agent for differentiation of the investigated hormogastrid populations. Our data suggest that the evolutionary lineages for *H. elisae* s.l. originated between the late Miocene and the early Pleistocene, but that mtDNA genealogies coalesce on a more recent scale of a few thousand years.

## IV.1. Introducción

*Hormogaster elisae* tiene un papel muy importante en los suelos del centro de la Península Ibérica, área de donde es endémica. Es una especie de lombriz de tierra que puede sobrevivir donde otras no lo hacen, ya que es abundante en suelos arenosos y pobres en materia orgánica, sometidos a fuerte erosión y aridez estival (Hernández 2005) y puede mantenerse en cámaras de estivación cuando las condiciones no son favorables (Ruiz 2003, Díaz Cosín *et al.* 2006, véase Figura I.5.A y B).

El Cambio Climático presumiblemente favorecerá la expansión de este tipo de suelos, incrementando de esta forma la importancia ecológica de las lombrices de la Familia Hormogastridae y particularmente de *H. elisae*. Es por ello que sería de gran valor una información más detallada sobre la distribución de las especies, diversidad genética y estructuración de las poblaciones de esta Familia.

En un trabajo en realización sobre la morfología de *H. elisae*, destinado a definir su estatus taxonómico, se ha observado variabilidad en algunos caracteres como longitud, diámetro y número de segmentos al estudiar individuos procedentes de distintas localidades de Madrid y Segovia (Díaz Cosín *et al.* en prep., Figura IV.1), variabilidad que podría deberse tanto a factores ambientales (sobre todo a las propiedades del suelo), como genéticos. Esta variabilidad, a pesar de la constancia de los caracteres que normalmente son estudiados en lombrices, levantó sospechas acerca de la presencia de una heterogeneidad no descrita hasta el momento e hizo que fuera interesante estudiar la variabilidad genética subyacente.

Se conoce muy poco sobre la filogenia de la Familia Hormogastridae, existiendo exclusivamente descripciones morfológicas de las distintas especies. A nivel molecular el conocimiento es prácticamente nulo y sólo hay un trabajo, cuya herramienta son las alozimas (Cobolli Sbordoni *et al.* 1992), en el que se analizan la especiación, divergencia genética y paleogeografía de especies de distintos géneros de esta Familia. En ese estudio, no se incluyeron poblaciones de *H. elisae* en el área central de la Península Ibérica, por lo que su caracterización genética se presenta por primera vez en esta memoria.



**Figura IV.1.** Comparación de ejemplares de *Hormogaster elisae* procedentes de Siguero (Segovia), Redueña y Lozoyuela (Madrid).

Los objetivos de este estudio son determinar los niveles de diferenciación genética y estimar la cantidad de flujo génico existente entre las poblaciones de hormogástridos presentes en el centro de la Península Ibérica, así como estudiar las relaciones filogenéticas entre estas poblaciones. Finalmente, se proporciona información sobre las historias demográficas y evolutivas de las poblaciones de cada clado.

Para ello, se ha seleccionado una región del ADN mitocondrial, el gen que codifica la subunidad I de la enzima citocromo C oxidasa (COI). Este fragmento ha sido utilizado con éxito para estudiar las relaciones intra-específicas e intra-genéricas en anélidos (Black *et al.* 1997, Bely y Wray 2004, Hurtado *et al.* 2004, Jolly *et al.* 2005, Ocegüera-Figueroa *et al.* 2005, Halanych y Janosik 2006) y concretamente en lombrices de tierra (Pop *et al.* 2003, Chang y Chen 2005, Csuzdi *et al.* 2005, Pérez-Losada *et al.* 2005, Pop *et al.* 2005, Huang *et al.* 2007), debido a su alta tasa de mutación, particularmente en las terceras posiciones del codon (Halanych y Janosik 2006). Además, algunos estudios en varios grupos de animales han mostrado que un fragmento de 650 pares de bases de este gen es generalmente efectivo como una secuencia de

“código de barras”, proporcionando más de un 95% de resolución al nivel de especie (Hebert *et al.* 2003a, 2004a, 2004b, Barrett y Hebert 2005).

## **IV.2. Materiales y métodos**

### **IV.2.1. Recogida de muestras y estudio morfológico**

Se recogieron 82 individuos maduros de *H. elisae* en siete localidades del área central de la Península Ibérica (Madrid y Segovia). Los puntos de muestreo eran prados con más o menos arbolado, pero siempre con presencia de encinas en la propia parcela o en los alrededores. La zona puede dividirse en dos unidades geográficas principales: 1) Sierra de Guadarrama y 2) Depresión del Tajo (Figura IV.2, Tabla IV.1). Tras ser lavados con agua destilada, los individuos se conservaron en alcohol absoluto a -20°C. Se separaron 0,025 g de tegumento bajo la lupa, retirando las partículas de suelo persistentes y comprobando que el fragmento no contenía ningún parásito macroscópico. Es frecuente la presencia de parásitos en el tegumento de las lombrices de tierra (Edwards y Bohlen 1996), por lo que es imprescindible eliminarlos para prevenir posibles contaminaciones. El tejido se sometió a varios lavados con alcohol a distintas concentraciones y agua destilada para ser rehidratado. Se conservó posteriormente a -80°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Se estudiaron todos los caracteres morfológicos usados por Qiu y Bouché (1998) en la sistemática de los Hormogastridae en cada uno de los ejemplares de estas siete poblaciones, que incluyen la localidad tipo de la especie *H. elisae*, Sigüero (Figura IV.3).



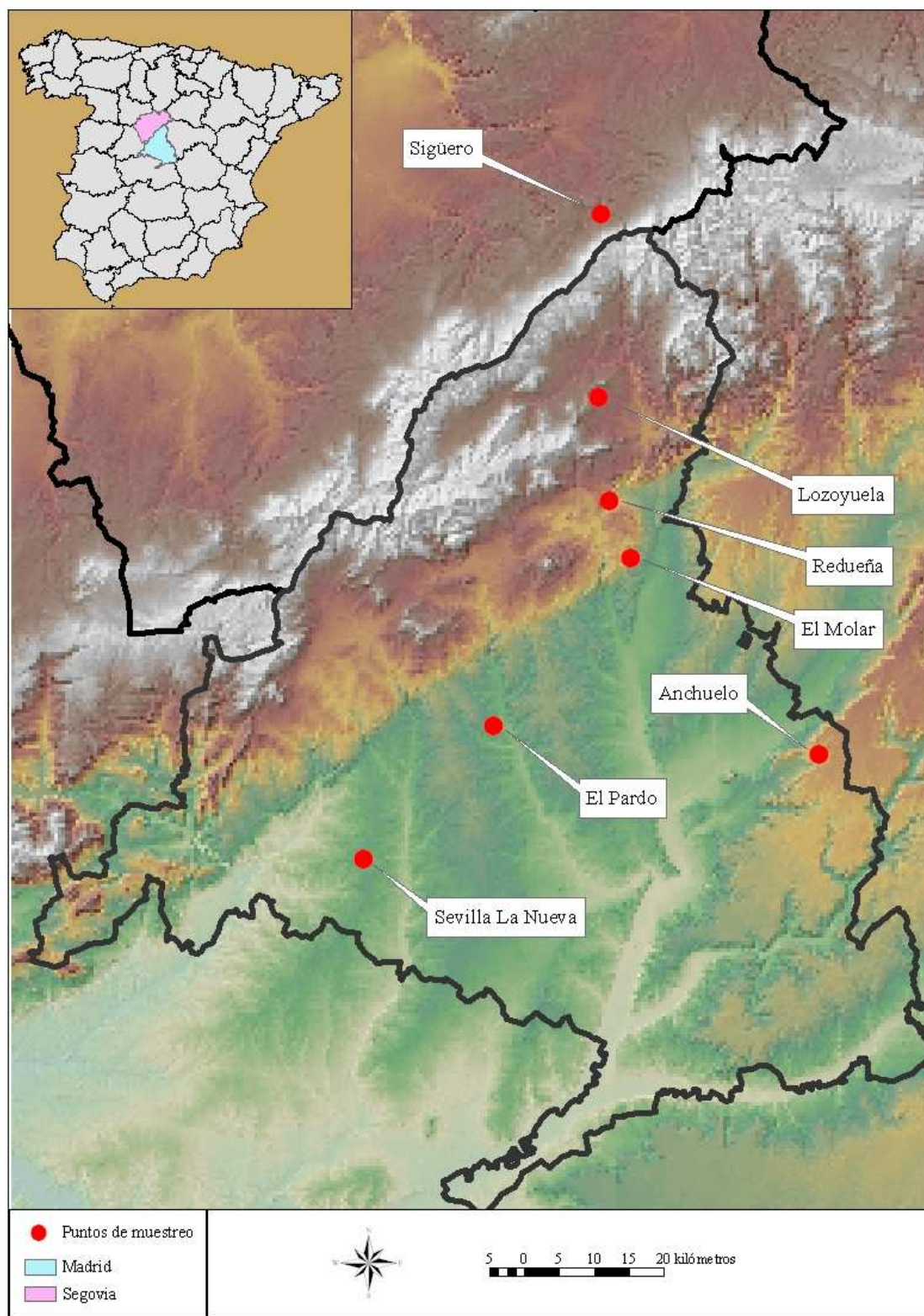


Figura IV.2. Mapa de situación de las localidades de muestreo de *Hormogaster elisae*.

Localidad	Abr.	Provincia	N	Localización GPS	Unidad geográfica	Altitud(m)
Anchuelo	ANC	Madrid	9	N40°28'50,2''W3°14'33,5''	D (Henares)	780
Lozoyuela	LOZ	Madrid	12	N40°56'51,9''W3°37'16,2''	S (zona alta cara sur)	1036
Molar	MOL	Madrid	12	N40°44'22,9''W3°33'53,1''	S (zona media cara sur)	817
Pardo	PAR	Madrid	12	N40°31'11,0''W3°47'42,7''	D (Manzanares)	730
Redueña	RED	Madrid	14	N40°48'46,7''W3°36'06,2''	S (zona media cara sur)	808
Sevilla la Nueva	SEV	Madrid	12	N40°20'41,9''W4°00'48,9''	D (Alberche)	650
Siguero	SIG	Segovia	11	N41°11'06,1''W3°37'07,4''	S (zona alta cara norte)	1061

**Tabla IV.1.** Localidades de muestreo de *Hormogaster elisae*. Se indica la abreviatura que se usa en los análisis (Abr.). N: número de individuos recogidos; D: Depresión del Tajo; S: Sierra de Guadarrama (la localización exacta se indica entre paréntesis).



**Figura IV.3.** Zona de muestreo de Siguero (localidad tipo) y ejemplares recogidos de *Hormogaster elisae*.

#### IV.2.2. Amplificación de ADN

Se aisló el ADN genómico total usando el kit de extracción DNeasy Tissue Kit de QIAGEN (IZASA, Barcelona, España). Se amplificó un fragmento del gen mitocondrial COI mediante PCR. Para ello se utilizaron los cebadores universales (Folmer *et al.* 1994) siguientes:

LCO1490: 5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG 3'

HCO2198: 5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3'

La reacción de PCR se realizó por individuo con 5 µl de tampón 10X libre de Mg de Biotools, 3,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2 µl de dNTPs (10 mM), 1 µl de cada cebador (20 µM), 1,25 µl de enzima polimerasa (1u/ µl) y 1 µl de ADN muestra y se completó con agua hasta 50 µl.

En algunos casos en los que no se obtenía producto, se añadió albúmina de suero bovino (6,25 µl, 1 µg/ µl, disminuyendo la cantidad de agua), lo que permitió obtener una PCR positiva. Los ácidos húmicos contenidos en el suelo son conocidos inhibidores de la PCR (Tsai y Olson 1992). Por ello, estas muestras procedentes de lombrices de tierra, que viven en el suelo y se alimentan de él, pueden ser problemáticas a la hora de obtener productos de PCR. Los métodos de purificación previa a la PCR suelen ser largos, encarecen el proceso y disminuyen la cantidad de ADN recuperado. Así, es preferible evitar la interferencia que producen los inhibidores con algún aditivo, en lugar de eliminarlos (Kreader 1996). Por esta razón, la albúmina de suero bovino ha tenido un uso extendido para evitar inhibiciones (Höss *et al.* 1992, Akane *et al.* 1993, Höss y Pääbo 1993, Romanowski *et al.* 1993).

El programa utilizado para la PCR fue de 96°C (3 minutos), 40 ciclos de [95°C (30 segundos), 50°C (45 segundos), 72°C (1 minuto)], con una extensión final de 5 minutos a 72°C. El fragmento amplificado se visualizó en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y aquellos que fueron positivos se purificaron con el kit de purificación BIOCLEAN DNA Purification Columns (Biotools, Madrid, España). La

secuenciación se llevó a cabo en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Servicio Central de la UCM).

### IV.2.3. Análisis de datos

Se verificó que las secuencias fueran de lombriz de tierra mediante la comparación con secuencias conocidas en la base de datos GenBank usando el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.* 1997). A continuación se alinearon con CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997).

#### IV.2.3.a. Variación inter e intrapoblacional

Las estimas de la variabilidad poblacional se llevaron a cabo con el programa ARLEQUIN v. 2.000 (Schneider *et al.* 2000). Se expresa la variación dentro de las poblaciones como diversidad haplotípica ( $H$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y número de sitios polimórficos ( $S$ ). La divergencia genética media entre y dentro de poblaciones se estimó usando el modelo de evolución de secuencia Kimura 2-parámetros (1980) y se calcularon los valores de  $\Phi_{ST}$  (análogo de  $F_{ST}$ ) por pares, para lo que se tuvo en cuenta la variación de las frecuencias haplotípicas entre poblaciones y la distancia genética basada en la variación nucleotídica.

Para estudiar la posible presencia de una estructura poblacional se llevó a cabo un análisis de la varianza molecular (AMOVA) (Weir y Cockerham 1984, Excoffier *et al.* 1992). El cálculo de la significación (nivel de 5%) de las comparaciones por pares (análisis jerárquicos) de  $\Phi_{ST}$  entre localidades, se basó en 1.000 permutaciones de la matriz de datos.

Para examinar la posible existencia de aislamiento por distancia, se realizó un test de Mantel (Mantel 1967), que correlaciona la matriz de distancia genética entre localidades (Kimura 2-parámetros en este caso) y su distancia geográfica (medida como línea recta que separa dos lugares de muestreo). Para ello se utilizó el programa IBD, *Isolation by distance* (Jensen *et al.* 2005). La significación de la correlación de matrices se evaluó comparando el estadístico del test de Mantel  $Z$ , cuya distribución aleatoria se obtuvo tras 10.000 permutaciones. Este test se usa para estudiar la correlación entre



matrices de distancias porque los casos no son independientes y por ello, no se puede usar un coeficiente de correlación simple. Así, el test de Mantel calcula la correlación de las matrices originales y permuta una de ellas  $n$  veces, recalculando la correlación. Si las matrices originales están realmente correlacionadas, las permutaciones provocarán una reducción en el coeficiente de correlación.

Se construyó una red de haplotipos utilizando la parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992, Crandall *et al.* 1994) y un límite de conexión de 200 cambios mutacionales con el programa TCS v. 1.12 (Clement *et al.* 2000). Este programa resume las secuencias en haplotipos y los conecta entre sí, generando haplotipos intermedios no muestreados y calculando el número de saltos mutacionales que permite la parsimonia estadística. Si el número de cambios es mayor que este límite, las redes se presentan inconexas. La construcción de redes de este tipo se ha recomendado para los estudios filogenéticos intraespecíficos (Posada y Crandall 2001), pues los procesos evolutivos que actúan a nivel poblacional generan relaciones reticuladas y los métodos tradicionales de reconstrucción de filogenias (basados en árboles bifurcados) no representan ese tipo de relaciones. Los árboles sitúan a todos los haplotipos en los nodos terminales, asumiendo que los haplotipos ancestrales están extintos, cuando según la teoría de la coalescencia, esos haplotipos son los más frecuentes en la población, presentando un gran número de conexiones mutacionales con los haplotipos más recientes (Watterson y Guess 1977, Crandall y Templeton 1993).

#### **IV.2.3.b. Relaciones filogenéticas**

Se realizaron los análisis de Vecino más Próximo (Neighbour-Joining, NJ), Máxima Parsimonia (Maximum Parsimony, MP), Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood, ML) y Bayesiano (Bayesian inference, BI), para lo que se incluyeron dos especies distintas del género *Hormogaster*: *H. riojana* (Alesanco, La Rioja, España) descrita por Qiu y Bouché (1998) y *H. pretiosa* (Cervera del Maestre, Castellón de la Plana, España) en el sentido de Zicsi (1970), cuyas secuencias se obtuvieron en nuestro laboratorio por el mismo procedimiento explicado anteriormente.

Los análisis de NJ, MP y ML se implementaron en el programa PAUP 4.0b3 (Swofford 2002). Los tests de probabilidad (Likelihood ratio tests) fueron ejecutados

con MODELTEST 3.0 (Posada y Crandall 1998). Estos tests indicaron que el modelo Hasegawa-Kishino-Yano (Hasegawa *et al.* 1985) con distribución gamma y sitios invariables (HKY+I+G) es el que mejor se ajustaba a los datos. Este modelo se utilizó en la estima de la filogenia en los análisis de NJ y ML. En los análisis de ML y MP se utilizaron búsquedas heurísticas y TBR (tree bisection and reconnection) con diez adiciones aleatorias paso a paso “random stepwise additions”. Se realizó un análisis de Bootstrap (Felsenstein 1985) para estimar el soporte de las topologías resultantes, con 1.000 repeticiones para los análisis NJ y MP y 100 para el análisis ML. La estima de la filogenia Bayesiana se llevó a cabo con el programa MRBAYES v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). El soporte de los clados se estimó usando el algoritmo de Monte Carlo a partir de simulaciones de cadenas de Markov. Se utilizó también el modelo de sustitución HKY+I+G. Cada cadena de Markov (de cuatro: una fría y tres calientes) comenzó a partir de un árbol aleatorio y se ejecutó durante cuatro millones de generaciones, generándose así 8.000 árboles (muestreo cada 500 generaciones). El análisis se repitió dos veces. Los árboles generados antes de que los valores de verosimilitud de las cadenas se estabilizaran fueron descartados, y el resto se combinaron para estimar la filogenia con máxima probabilidad posterior.

Las secuencias de ADN fueron traducidas a secuencias de aminoácidos con el programa DnaSP v. 4.0. (Rozas *et al.* 2003) utilizando el código genético mitocondrial de *Lumbricus terrestris* (Boore y Brown 1995). Se llevaron a cabo análisis de filogenia también con los datos de aminoácidos, incluyendo además la secuencia traducida de *L. terrestris* (como grupo externo, número de acceso a GenBank, U24570) así como *H. riojana* y *H. pretiosa* (como referencias), ya que en el caso de las secuencias de aminoácidos las diferencias eran menores y era necesario incluir un grupo externo más alejado. Se realizaron análisis de NJ, MP y ML.

#### **IV.2.3.c. Historia demográfica**

Para tratar de inferir la historia demográfica de las poblaciones se determinaron parámetros de genética de poblaciones a partir de los datos genéticos. Se detectaron expansiones demográficas históricas mediante el examen de la distribución de frecuencias de las diferencias por pares de secuencias (distribución Mismatch) dentro de las poblaciones (Slatkin y Hudson 1991, Rogers y Harpending 1992). Se comprobó la

concordancia de nuestros datos con una distribución propia del “modelo de expansión repentina” de Rogers (1995) mediante una aproximación de mínimos cuadrados (Schneider y Excoffier 1999) implementada en ARLEQUIN. Para las distribuciones que no se desviaron significativamente ( $P > 0,05$ ) de las predicciones del modelo de expansión repentina, se calculó  $\tau$ , un índice del tiempo que ha pasado desde la expansión expresado en unidades de tiempo mutacional (Slatkin y Hudson 1991). Los intervalos de confianza de  $\tau$  se estimaron a partir de 10.000 repeticiones de Bootstrap.

Se utilizó la relación  $\tau = 2ut$  para estimar el tiempo de expansión por generación ( $t$ ) para las poblaciones de *H. elisae*, donde  $u$  es la tasa de mutación por secuencia y generación y  $t$  es el tiempo que pasó desde la expansión. El valor de  $u$  se calculó a partir  $u = 2\mu k$ , donde  $\mu$  es la tasa de mutación por nucleótido y  $k$  es el número de nucleótidos del fragmento analizado. Chang y Chen (2005) calcularon la tasa evolutiva para el COI de lombrices de tierra, que resultó ser 3,5% por millón de años, usando secuencias de *Metaphire yuhsi* y considerando los eventos geológicos conocidos que pudieron haber causado la separación de los clados. El tiempo de generación utilizado para el cálculo fue de un año, ya que ese es el tiempo aproximado que *H. elisae* necesita para alcanzar la madurez (adquisición del clitelo) (Díaz Cosín *et al.* 2009). Se ha visto que las distribuciones Mismatch son muy conservadoras (Ramos-Onsins y Rozas 2002), por lo que para tener una visión más amplia del escenario evolutivo, se comprobó también la falta de ajuste con el modelo de neutralidad de Wright-Fisher, consistente con la expansión de las poblaciones, por medio de otros estadísticos como Fu's  $FS$ , Fu y Li's  $F^*$ , Fu y Li's  $D^*$  y Tajima's  $D$  calculados con el programa DnaSP v. 4.0 (Rozas *et al.* 2003).

### IV.3. Resultados

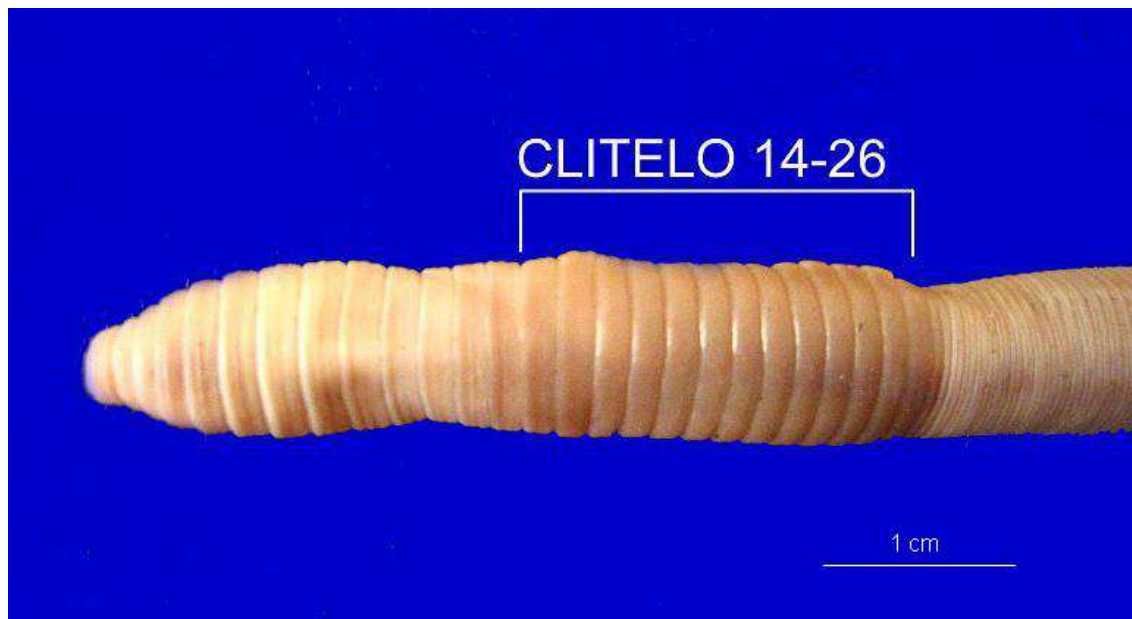
#### IV.3.1. Características morfológicas

Todos los individuos estudiados presentaron los siguientes caracteres:

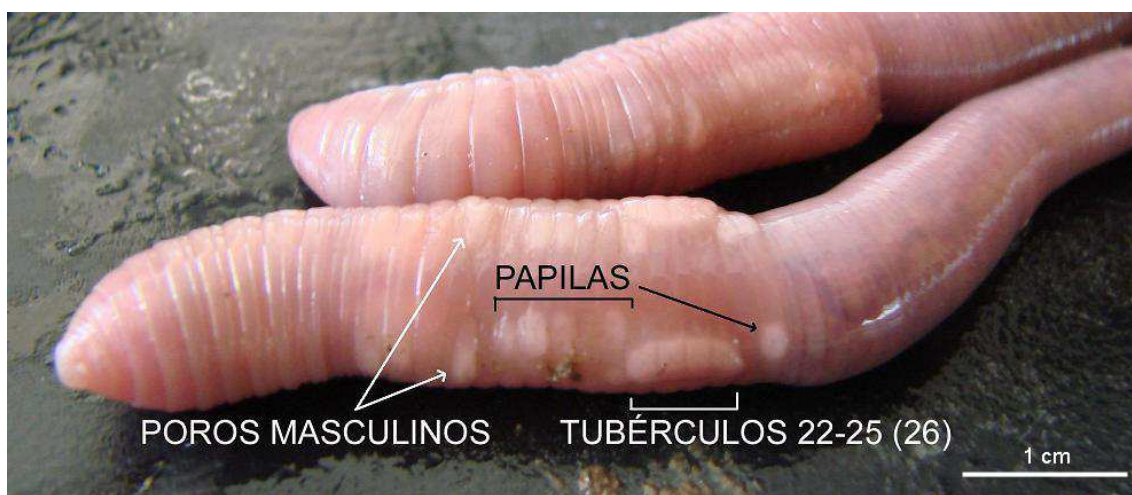
##### IV.3.1.a. Morfología externa:

- Prostomio epilóbico o proepilóbico
- Segmentos con anillación doble, tripe o cuádruple a lo largo del cuerpo
- Quetas pequeñas, estrechamente pareadas, con distancia entre ellas variable. Por detrás del segmento 11 algunas se diferencian como quetas sexuales (Figura IV.6) y en los segmentos postclitelaes son especialmente finas y difíciles de apreciar, llegando incluso a no ser visibles en algunos pares
- Ausencia de poros dorsales
- Dos pares de espermatecas, cuyos poros se sitúan en los surcos intersegmentarios 9/10 y 10/11, en posición lateral a la altura de la línea de quetas *cd*
- Posición del clitelo en (13)14(15)-26(27)28, con límite anterior poco nítido (Figura IV.4)
- Poros femeninos localizados lateralmente en la mitad del segmento 14, a la altura de quetas *b*
- Poros masculinos localizados centralmente cerca del surco intersegmentario 15/16, rodeados por rebordes glandulares entre las líneas de quetas *a* y *b* (Figuras IV.5 y IV.6)
- Tubérculos pubertarios formando líneas ventrales en posición 22(23)-25(26) (Figura IV.5)
- Papilas genitales muy bien desarrolladas pero de posición variable (Figuras IV.5 y IV.6)





**Figura IV.4.** Vista dorsal de la parte anterior de un individuo de *Hormogaster elisae* de la población de Siguero donde se muestra la posición del clitelo.



**Figura IV.5.** Vista ventral de la parte anterior de individuos de *Hormogaster elisae* de la población de Siguero donde se muestra la posición de los poros masculinos (15/16), los tubérculos 22-25 (26) y las papilas de posición variable.



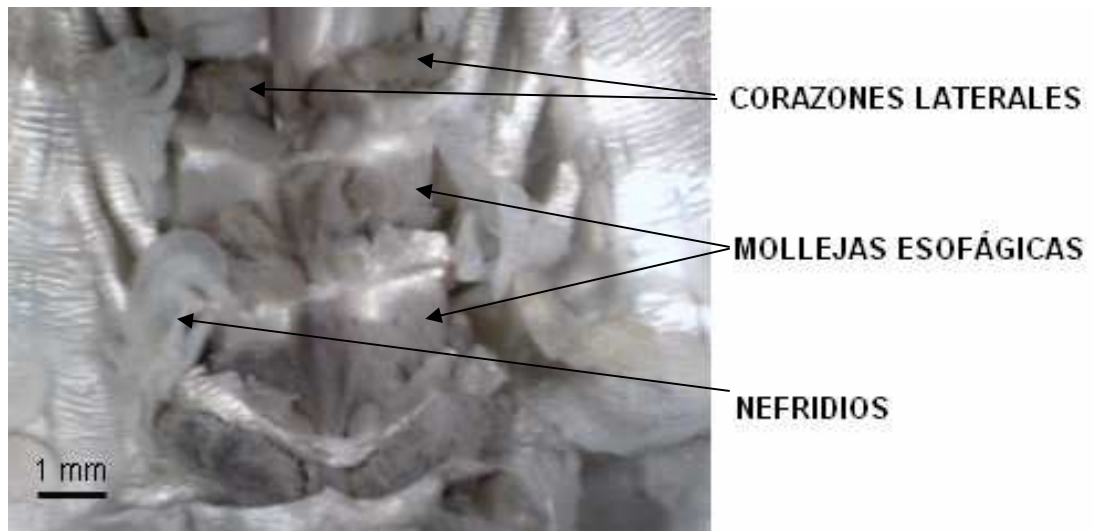
**Figura IV.6.** Detalle de las papilas donde se intuyen las quetas sexuales y de los poros masculinos rodeados por un borde glandular.

#### **IV.3.1.b. Anatomía interna:**

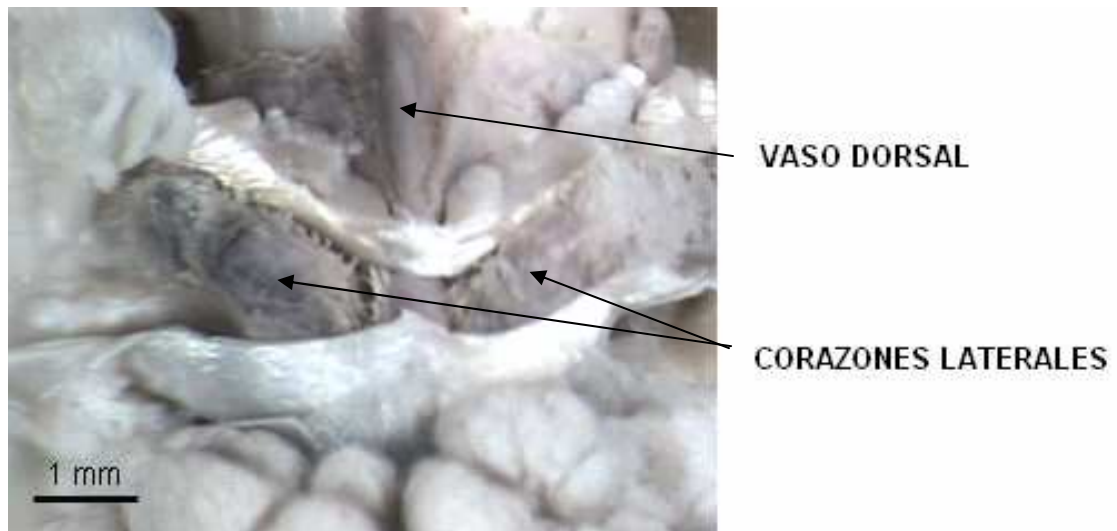
##### Sistema circulatorio:

(Figuras IV.7 y IV.8)

- Siete pares de corazones laterales localizados en los segmentos 5 al 11
- Vaso dorsal más grueso que vaso ventral



**Figura IV.7.** Morfología interna de los segmentos anteriores de *Hormogaster elisae*: corazones laterales, mollejas esofágicas muscularizadas y nefridios.



**Figura IV.8.** Detalle de los corazones laterales

Aparato digestivo:

- Tres mollejas esofágicas en los segmentos 6, 7 y 8 (Figura IV.7)
- Ausencia de glándulas de Morren y de buche
- Comienzo del intestino en segmento 16
- Inicio del tiflosol entre 19/20 y 22/23, enseguida aparecen las cinco láminas típicas que se mantienen durante un mínimo de 30 ó 40 segmentos, luego se atenúan en pocos segmentos, para adoptar una forma simple. Fin del tiflosol en 120 a 140, dejando alrededor de 80 a 90 segmentos atiflosolados (Figura IV.9)

Aparato reproductor masculino:

(Figura IV.10)

- Dos pares de testículos localizados en los segmentos 10 y 11
- Dos pares de embudos seminales de gran tamaño, que se corresponden con cada par de testículos y tienen aspecto de roseta y color blanquecino e iridiscente
- Dos pares de vesículas seminales muy grandes en los segmentos 11 y 12, que se presentan como masas de color blanquecino, beige o marrón

Aparato reproductor femenino:

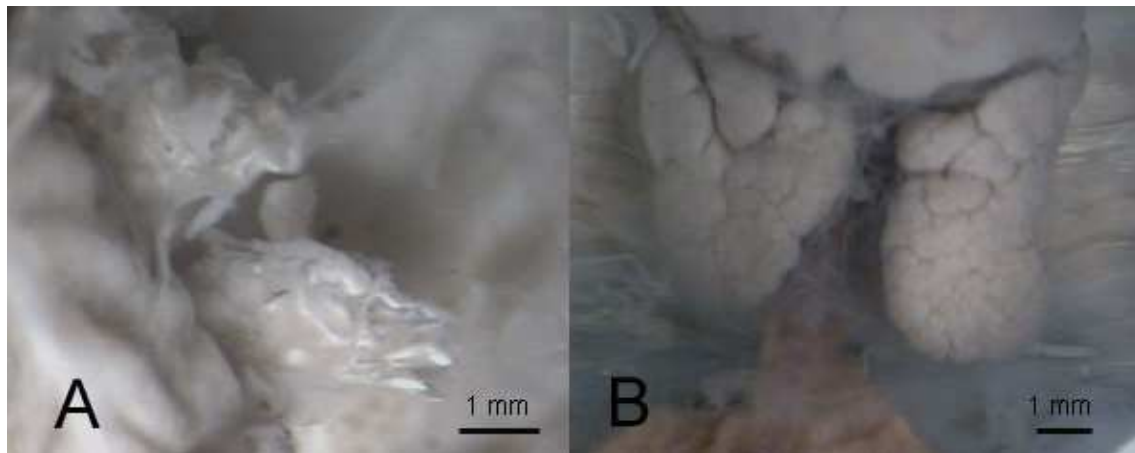
- Un par de ovarios y dos embudos ováricos unidos a oviductos cortos que se sitúan en el segmento 13
- Dos pares de espermatecas en segmentos 9 y 10, siendo el último par mucho mayor (véase Figura III.2)
- Ovisacos localizados en segmento 14

Vesículas nefridianas

Con forma de U muy cerrada en los primeros segmentos. Conforme se progresa hacia atrás las ramas se van abriendo y toman una forma de una V muy abierta, hasta que las ramas se abren tanto que la vesícula adopta forma de una salchicha o similar.



**Figura IV.9.** Vista dorsal de una disección de *Hormogaster elisae* recogido en Anchuelo en la que se aprecia la evolución del tiflosol a lo largo del cuerpo.



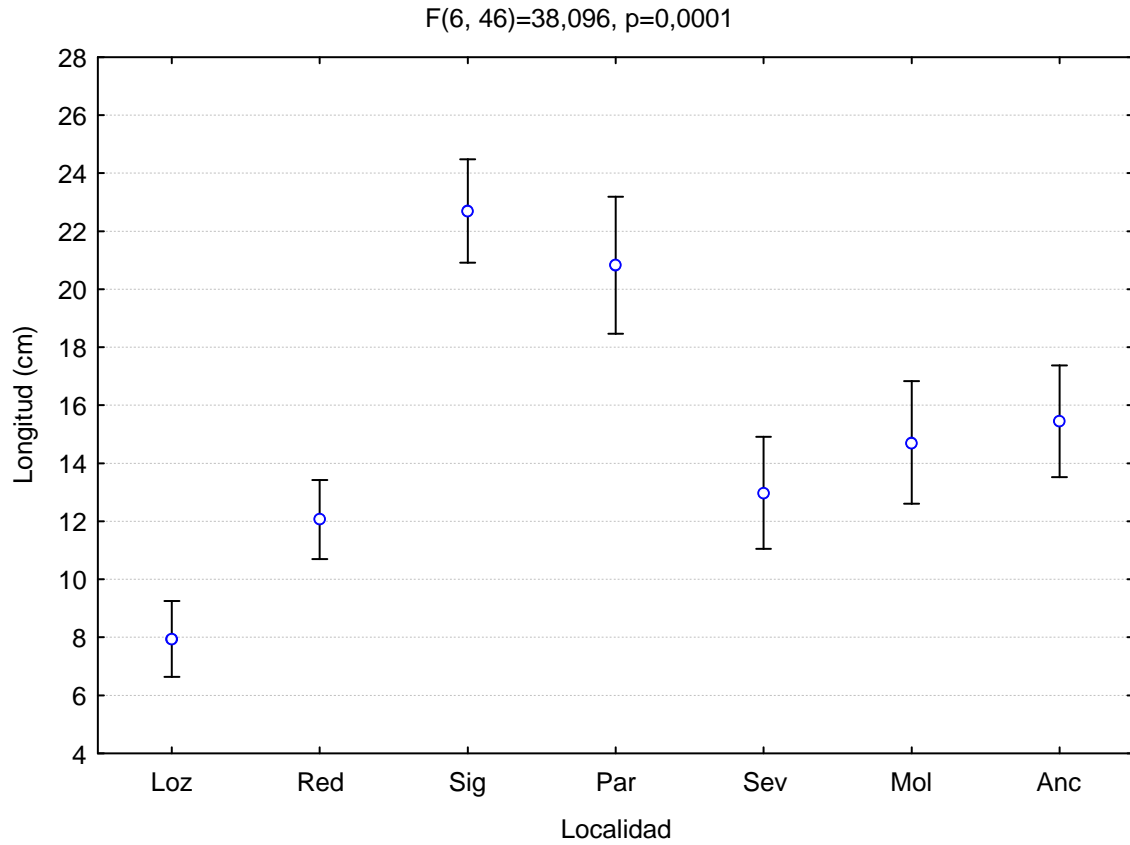
**Figura IV.10.** Detalles del aparato reproductor masculino. A: embudos seminales, B: vesículas seminales.

El estudio morfológico permite asegurar claramente que los 82 individuos recogidos en el área estudiada corresponden a la especie nominal *H. elisae* porque presentan constancia en un conjunto de caracteres propios que separan esta especie del resto de las especies del género *Hormogaster*. Estos caracteres son:

- La posición del clitelo en (13)14(15)-26(27)28
- La posición de los tubérculos pubertarios en 22(23)-25(26)
- La presencia de dos pares de espermatecas en los segmentos 9 y 10, siendo las anteriores de menos tamaño que las posteriores
- La existencia de un tiflosol con cinco láminas en su parte inicial

A pesar de la constancia de este conjunto de caracteres, los más importantes en la taxonomía del grupo, se encontraron diferencias significativas en otros caracteres como la longitud (medida en individuos fijados en alcohol) de los especímenes de las distintas localidades (ANOVA,  $F_{6,46}=38,096$ ,  $P<0,001$ ). Los individuos de mayor longitud resultaron ser los de Sigüero (22,7 cm) y los de menor longitud los de Lozoyuela (7,95 cm) (Tabla IV.2, Figura IV.11). Las comparaciones a posteriori mostraron que se podrían establecer tres grupos de tamaño:

- 1) Sigüero y El Pardo
- 2) Redueña, Sevilla la Nueva, El Molar y Anchuelo
- 3) Lozoyuela



**Figura IV.11.** Comparación de las medias de longitud de los individuos de *Hormogaster elisae* procedentes de las distintas localidades. Véanse en Tabla IV.1 las abreviaturas de cada localidad. Las barras verticales indican un intervalo de confianza de un 95%.

Localidad	Longitud (cm)
Anchuelo	15,45 (0,96)
Lozoyuela	7,95 (0,65)
Molar	14,72 (1,05)
Pardo	20,82 (1,17)
Redueña	12,06 (0,68)
Sevilla la Nueva	12,98 (0,96)
Siguero	22,7 (0,89)

**Tabla IV.2.** Valores medios de longitud de los individuos de *Hormogaster elisae* (fijados en alcohol) procedentes de las distintas localidades (se indica la varianza entre paréntesis).

## IV.3.2. Variación de la secuencia

Se amplificó un fragmento de COI de 648 pares de bases, correspondiente a las posiciones 65 a 712 de *L. terrestris* (Boore y Brown 1995). Este fragmento resultó tener 211 posiciones polimórficas, de las cuales 200 son informativas y once son variaciones individuales. Treinta y cuatro de las posiciones polimórficas (16,11% de las posiciones variables) se encontraron en la primera posición del codon, dos (0,95%) en la segunda y la mayoría, 175 (82,94%) se localizaron en la tercera. No se encontraron inserciones ni deleciones. En el Anexo I se muestra el alineamiento con las posiciones variables y en la Tabla IV.3 las frecuencias nucleotídicas. El contenido A+T medio fue 59,8%.

Se identificaron 38 haplotipos en el análisis de los 82 individuos, todos exclusivos de localidad, lo que indica un alto grado de polimorfismo. Todas las secuencias se depositaron en la base de datos GenBank, con los números de acceso: EF653868-EF653905 para los individuos de *H. elisae* (Anexo II), EF653906 y EF653907 para *H. riojana* y *H. pretiosa* respectivamente. La información completa de las frecuencias haplotípicas para cada punto de muestreo se muestra en el Anexo II y los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica se muestran en la Tabla IV.4. El número de haplotipos por localidad fue de tres a siete (Tabla IV.4). Los valores totales de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron  $H=0,97$  y  $\pi=0,131$  respectivamente.

	Anchuelo	Lozoyuela	Molar	Redueña	Pardo	SevillaN.	Siguero	Media
<b>C</b>	22,24%	21,69%	21,31%	21,57%	20,23%	21,09%	21,02%	21,3%
<b>T</b>	34,12%	31,70%	31,66%	30,81%	34,25%	33,87%	34,08%	32,9%
<b>A</b>	25,46%	26,97%	27,34%	27,74%	27,48%	26,52%	26,67%	26,9%
<b>G</b>	18,18%	19,64%	19,69%	19,87%	18,04%	18,52%	18,24%	18,9%
<b>A+T</b>	59,58%	58,67%	59%	58,55%	61,73%	60,39%	60,75%	59,8%
<b>G+C</b>	40,42%	41,33%	41%	41,44%	38,27%	39,61%	39,26%	40,2%

**Tabla IV.3.** Frecuencias nucleotídicas por localidades en la secuencia de COI de *Hormogaster elisae*.



Localidad	N	NHAP	<i>H</i>	$\pi$	<i>S</i>	Ts	Tv	K2P
Anchuelo	9	6	0,92 (0,07)	0,003 (0,002)	5	4	1	0,27
Lozoyuela	12	5	0,83 (0,07)	0,016 (0,009)	23	19	4	1,58
Molar	12	7	0,91 (0,06)	0,010 (0,006)	21	17	4	1,03
Redueña	14	5	0,70 (0,10)	0,038 (0,020)	49	43	6	3,84
Pardo	12	5	0,76 (0,09)	0,002 (0,002)	5	5	0	0,25
Sevilla N.	12	3	0,67 (0,09)	0,002 (0,001)	3	2	1	0,17
Siguero	11	7	0,82 (0,12)	0,009 (0,005)	15	15	0	0,92

**Tabla IV.4.** Medidas de variabilidad intrapoblacional para *Hormogaster elisae* en las distintas localidades. Los valores entre paréntesis indican la varianza. N: número de individuos recogidos en cada población; NHAP: número de haplotipos diferentes encontrados en una localidad; *H*: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica; *S*: número de sitios polimórficos; Ts: número de transiciones; Tv: número de transversiones; K2P: valores de divergencia genética intrapoblacional calculada mediante el modelo de Kimura 2-parámetros y expresada como porcentaje de cambios.

### IV.3.3. Variación inter e intrapoblacional

Los valores de divergencia genética se muestran en la Tabla IV.5. Se incluyen en este caso los valores de divergencia con *H. riojana* y *H. pretiosa* para proporcionar una referencia.

Se observa que en general las divergencias entre localidades son altas, cubriendo un rango que va desde el 5,75% que existe entre El Molar y Redueña, localidades más parecidas genéticamente, hasta el 20,2% que presentan las localidades que más difieren en sus secuencias, El Molar y Sevilla la Nueva. Es importante resaltar que los valores de divergencia genética entre algunas localidades son parecidos o incluso mayores que los valores entre especies. Así, *H. elisae* de la población de El Pardo y *H. riojana* divergen en un 17,45%, y la divergencia genética entre *H. riojana* y *H. pretiosa* es 15,83%, mientras Sevilla la Nueva y El Pardo tienen mayores valores de divergencia genética cuando se comparan con cualquier otra población. Existe variabilidad genética dentro de las localidades (Tabla IV.4), y concretamente en Redueña se observa una variabilidad intragrupo alta (3,84% de divergencia entre sus haplotipos).

Los resultados de la AMOVA (Tabla IV.6) mostraron que la mayor parte de la variación genética existente (92,59%) se debe a las diferencias existentes entre las

localidades muestreadas. El valor de  $\Phi_{ST}$  fue alto, indicando estructura genética poblacional significativa. Todas las comparaciones de  $\Phi_{ST}$  por pares de localidades fueron significativas (incluso tras la corrección de Bonferroni; valor crítico de significación de  $\alpha = 0,0024$ ) y los valores fueron muy altos (Tabla IV.7), indicando la ausencia de flujo génico entre las poblaciones.

	Anchuelo	Molar	Redueña	Lozoyuela	Siguero	Pardo	SevillaN	<i>H.riojana</i>
<b>Anchuelo</b>		<b>39,7</b>	<b>47,7</b>	<b>60,9</b>	<b>84,5</b>	<b>47</b>	<b>67</b>	
<b>Molar</b>	16,9		<b>8,5</b>	<b>23,4</b>	<b>49,7</b>	<b>31,3</b>	<b>58</b>	
<b>Redueña</b>	15	5,7		<b>15,1</b>	<b>41,5</b>	<b>36,4</b>	<b>62,5</b>	
<b>Lozoyuela</b>	17,3	13,1	10,9		<b>26,5</b>	<b>49,7</b>	<b>74,6</b>	
<b>Siguero</b>	15,2	15,2	12,9	17,3		<b>75,5</b>	<b>99,2</b>	
<b>Pardo</b>	18,3	19	17,9	19,7	18		<b>26,8</b>	
<b>Sevilla N.</b>	17,1	20,2	16,7	18,5	18,3	11,4		
<b><i>H.riojana</i></b>	19,7	20,9	19,8	22,1	20,9	17,4	18,8	
<b><i>H.pretiosa</i></b>	21,9	22,1	20,9	21,5	23,2	21	23,2	15,8

**Tabla IV.5.** Valores medios de divergencia genética (en porcentaje de cambios) corregida mediante el modelo Kimura 2-parámetros (triángulo inferior) y distancia geográfica (en Km, triángulo superior en negrita)

Fuente de variación	gl	Porcentaje de variación	$\Phi_{ST}$
Entre poblaciones	6	92,59	0,926 (P<0,0001)
Dentro de poblaciones	75	7,41	

**Tabla IV.6.** Resultados del AMOVA para COI dentro y entre localidades muestreadas (gl, grados de libertad).

	Anchuelo	Molar	Redueña	Lozoyuela	Siguero	Pardo
<b>Anchuelo</b>						
<b>Molar</b>	0,96					
<b>Redueña</b>	0,86	0,69				
<b>Lozoyuela</b>	0,94	0,91	0,80			
<b>Siguero</b>	0,96	0,94	0,83	0,93		
<b>Pardo</b>	0,99	0,97	0,89	0,96	0,97	
<b>Sevilla N.</b>	0,99	0,97	0,89	0,96	0,97	0,98

**Tabla IV.7.** Valores de  $\Phi_{ST}$  por pares entre las poblaciones de *Hormogaster elisae* estudiadas.

El test de Mantel mostró la existencia de una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas de las localidades ( $r = 0,5328$ ,  $P = 0,0219$ ,  $r^2 = 0,284$ ), que mejora sustancialmente realizando el análisis con la transformación logarítmica de la distancia geográfica ( $r = 0,6969$ ,  $P = 0,0086$ ,  $r^2 = 0,486$ ).

La red de haplotipos obtenida con el programa TCS se muestra en la Figura IV.12. La cantidad de cambios mutacionales permitidos con un nivel de parsimonia del 90% resultaron ser 16, formando así cada localidad su propia red desconectada de las demás. Para visualizar las conexiones entre localidades, se hizo el análisis permitiendo 200 cambios mutacionales, ya que las conexiones no parsimoniosas también se pueden considerar (Templeton *et al.* 1992). Así, en la figura se indica la cantidad de cambios que existen entre aquellos haplotipos que difieren en más de 16 posiciones. Se observa que en Redueña hay un haplotipo bastante abundante (RED5) que presenta una gran diferencia (41 pasos mutacionales) con el resto de haplotipos encontrados en la localidad, de magnitud parecida a la existente entre localidades (43 pasos de este mismo haplotipo de Redueña a El Molar). El resto de localidades forman linajes con sus haplotipos conectados parsimoniosamente. Las localidades de montaña presentan redes con sus haplotipos más dispersos que en el caso de las localidades de valle, lo que es señal de los distintos valores de diversidad nucleotídica, mayor en los puntos de muestreo de montaña.

#### IV.3.4. Relaciones filogenéticas

Los datos se analizaron empleando cuatro métodos de inferencia filogenética: Inferencia Bayesiana (BI), Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) y método de agrupamiento de distancias de Vecino más Próximo (NJ). Los árboles obtenidos mediante los diferentes tratamientos de los datos presentaron topologías congruentes. La robustez de los agrupamientos está confirmada por los altos valores de Bootstrap. Sin embargo, las relaciones entre los haplotipos de una misma localidad mostraron algunas diferencias dependiendo del análisis empleado. El árbol de ML (log likelihood: - 3.496,43935) se muestra en la Figura IV.13, donde se indican los valores de Bootstrap y probabilidad posterior obtenidos en aquellas agrupaciones coincidentes en MP, NJ y BI.

De acuerdo con todos los análisis filogenéticos, las poblaciones de la morfoespecie *H. elisae* en el área central de la Península Ibérica presentaron dos grandes grupos, diferenciándose claramente las poblaciones de El Pardo y Sevilla la Nueva del resto. A continuación se pueden identificar algunos subclados: (I) El Molar y Redueña, (II) Lozoyuela, (III) Sigüero, (IV) Anchuelo, (V) El Pardo, (VI) Sevilla la Nueva, la mayoría con valores de Bootstrap de 100% y probabilidad posterior de 1,00. Dentro del subclado I, hubo diferencias en la topología de los árboles obtenidos por ML y BI con aquellos obtenidos con NJ y MP. Los árboles de ML y BI representaban los haplotipos de Redueña formando un grupo parafilético, con el haplotipo RED5 fuera del grupo formado por el resto de haplotipos de la misma población, mientras que los árboles de NJ y MP representaban Redueña como una población monofilética. Sin embargo, la población de El Molar era monofilética en todos los casos, con un soporte Bootstrap de 100% y 1,00 de probabilidad posterior. Así, los análisis filogenéticos mostraron seis grupos monofiléticos con alto soporte, congruentes con la localización geográfica de los haplotipos, presentando El Molar y Redueña (cuya distancia geográfica es tan sólo 8,5 Km) como una sola unidad evolutiva.

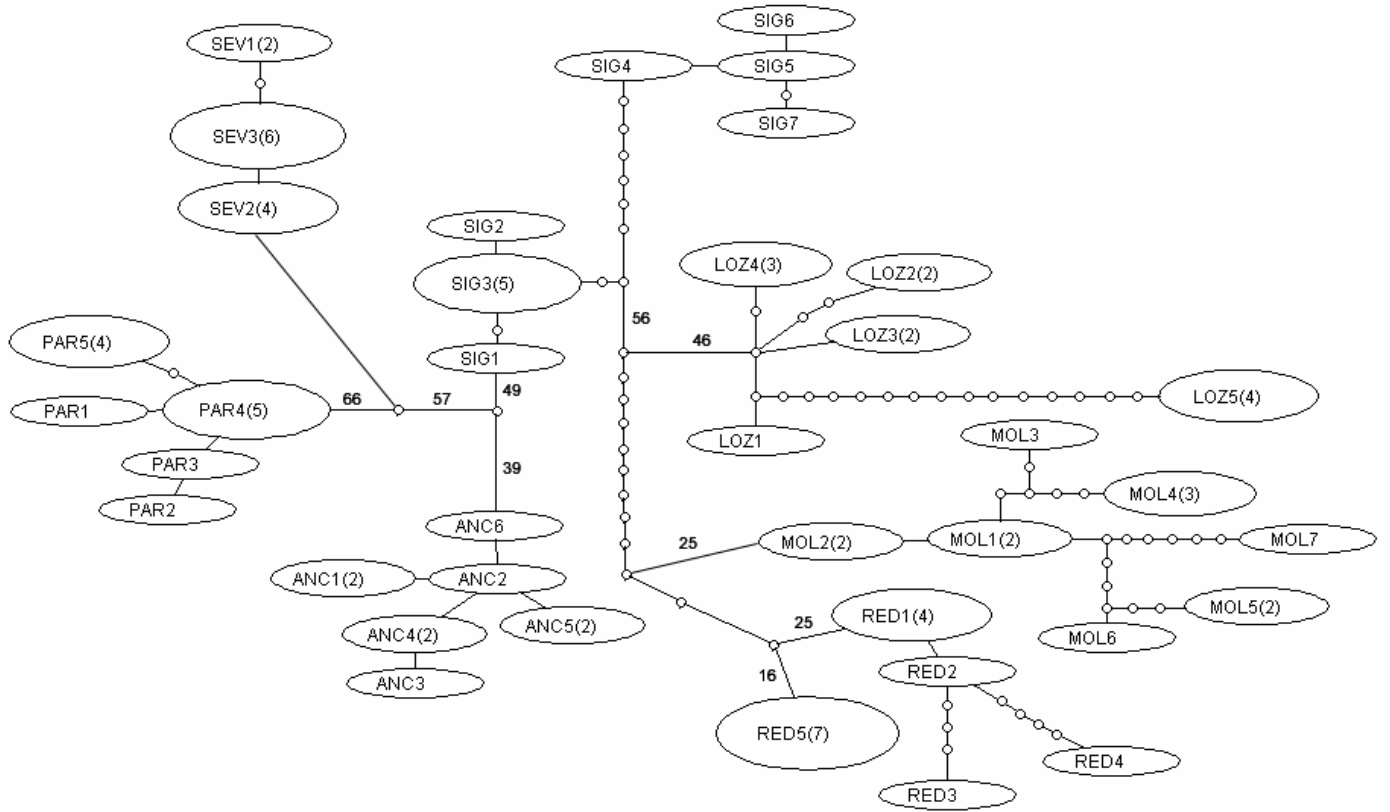
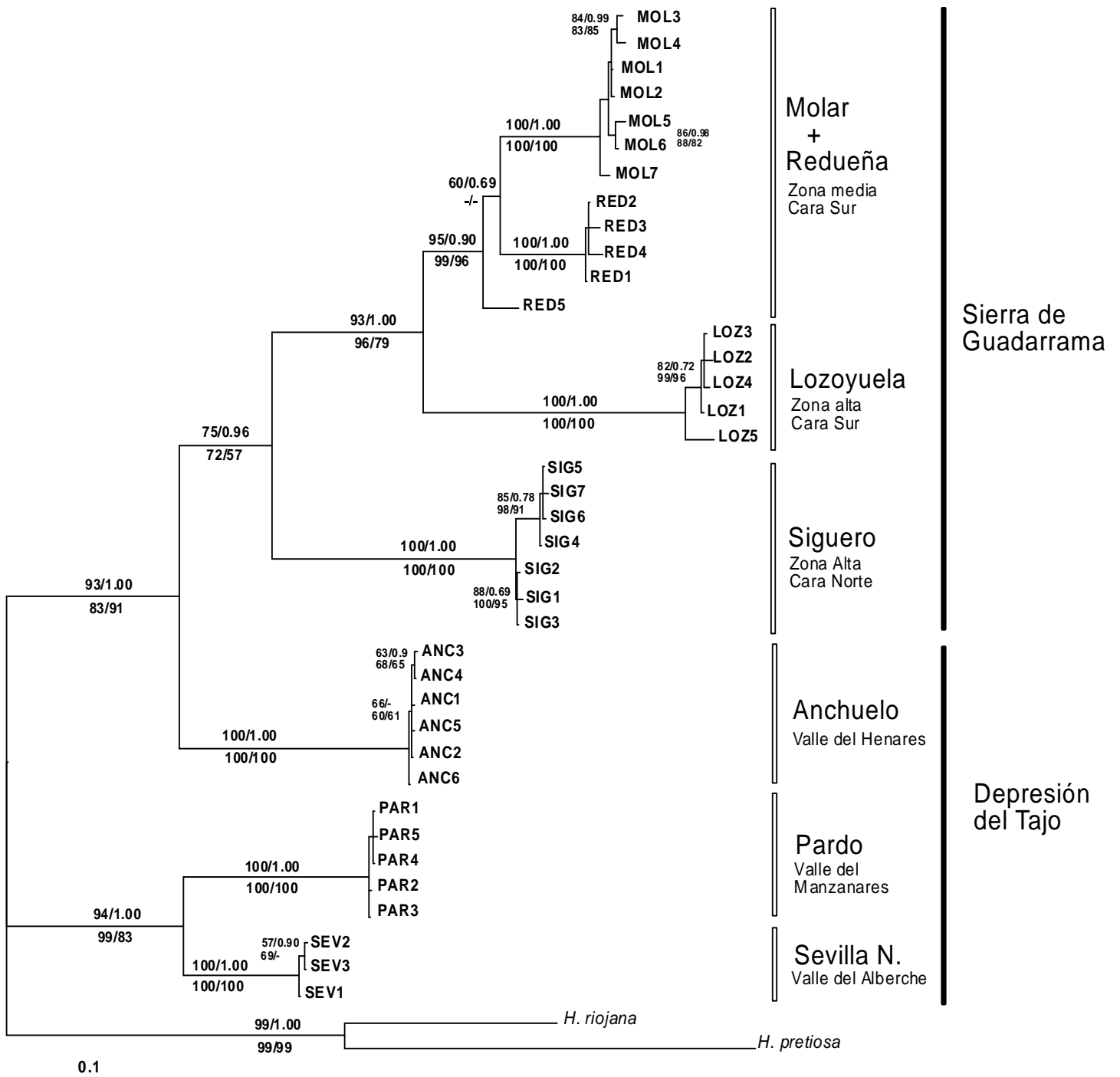


Figura IV.12. Red de los 38 haplotipos de COI de *Hormogaster elisae* generada por el programa TCS. El límite de conexión fueron 200 pasos. Cada haplotipo se nombra con la abreviatura de la localidad (véase Tabla IV.1) y con el número de haplotipo. En aquellos que incluyen más de un individuo, se muestra entre paréntesis su frecuencia, de la cual depende el tamaño del óvalo. Los círculos vacíos son haplotipos intermedios (no muestreados). Cada rama representa un cambio mutacional pero en los casos en los que el número de cambios mutacionales entre haplotipos supera 16 (límite de parsimonia al 90%), se indica su número en la rama correspondiente. La longitud de las ramas no contiene información.



**Figura IV.13.** Árbol de Máxima Verosimilitud (ML) (log likelihood: -3.496,43935, modelo de evolución de secuencia de HKY+I+G) basado en el análisis de un fragmento de 648 pares de bases del gen COI en las poblaciones muestreadas de *Hormogaster elisae*. Se muestran los valores de Bootstrap (100 pseudoréplicas) en la parte superior de las ramas cuando son superiores a 50%. Se muestran también los valores de probabilidad posterior del análisis bayesiano (BI) en las asociaciones coincidentes cuando son mayores que 0,50 (ML/BI). Los valores de soporte de Bootstrap del análisis del vecino más próximo (NJ) y Máxima Parsimonia (MP) (1000 pseudoréplicas) se muestran en la parte inferior de las ramas (NJ/MP). Los haplotipos se representan con la abreviatura de la localidad de la que proceden (véase Tabla IV.1) y su número.

La secuencia de nucleótidos traducida contenía 215 aminoácidos (de 645 posiciones de ADN incluidas). La mayor parte de las sustituciones en la secuencia de ADN eran sinónimas, por lo que la secuencia de aminoácidos no presentaba demasiadas diferencias. Tan sólo se encontraron diferentes aminoácidos en nueve de las posiciones de la secuencia estudiada, siendo tres de ellas informativas y el resto variaciones individuales. El alineamiento con las posiciones variables de la secuencia de aminoácidos se muestra en la Tabla IV.8.

Los árboles obtenidos con las secuencias de aminoácidos no resultaron tener unos índices de Bootstrap demasiado altos. Aun así, se muestra en la Figura IV.14 como ejemplo, el árbol generado por el análisis de NJ, ya que se considera que puede ser informativo. Se observa así, que los individuos de las localidades de El Molar, Redueña y Lozoyuela se agrupan, mezclándose entre sí, mientras que el resto de clados son similares a los obtenidos con el análisis del ADN.

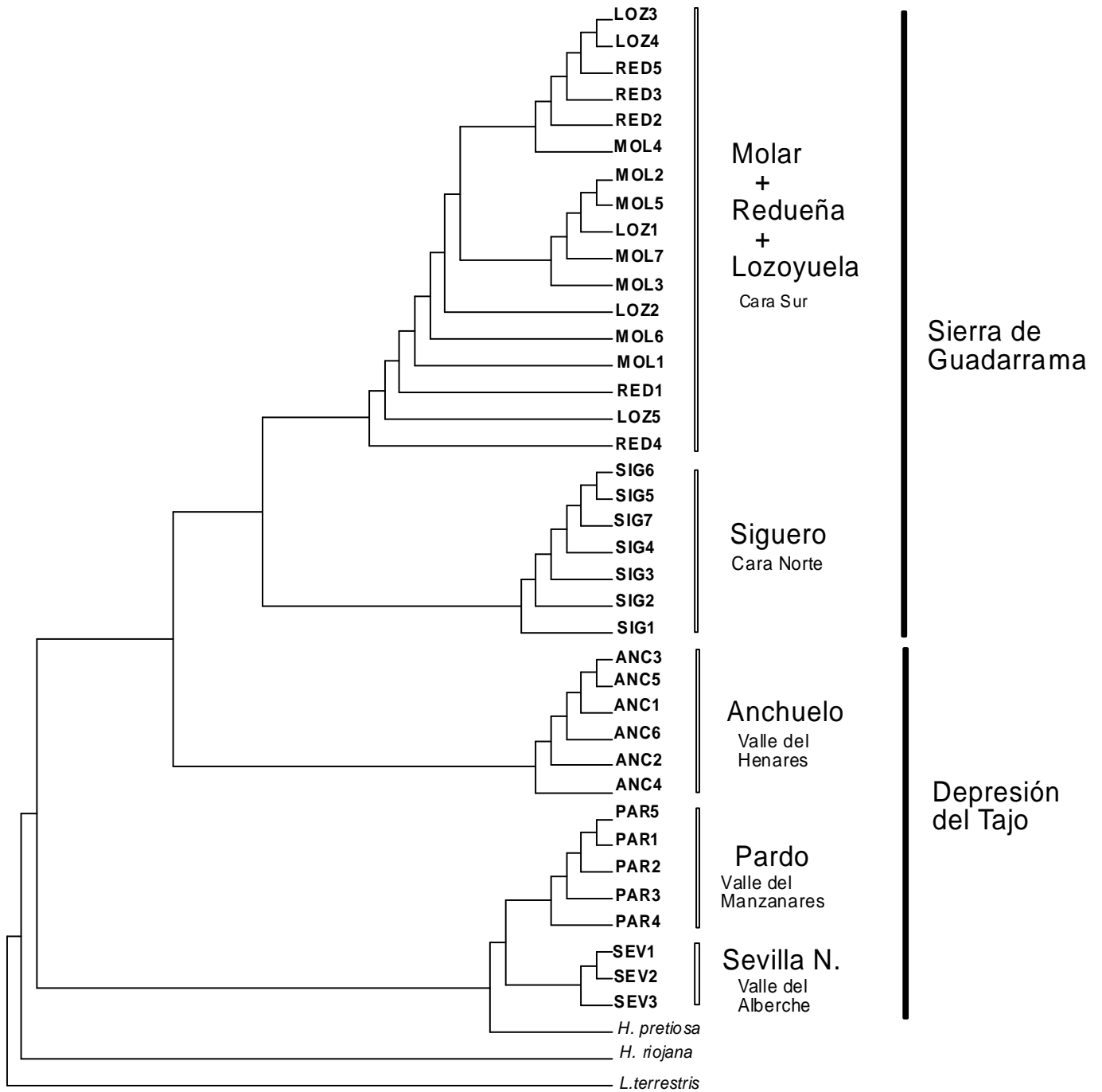
#### **IV.3.5. Historia demográfica**

Se contrastaron las distribuciones Mismatch para cada una de las seis unidades evolutivas que resultaron del análisis filogenético. Las distribuciones de Anchuelo, El Pardo, Sevilla la Nueva y Sigüero no se desviaron significativamente ( $P > 0,05$ ) de lo esperado por el modelo de expansión repentina y por ello eran adecuados para el análisis de los patrones demográficos. Las distribuciones del clado Molar-Redueña y de Lozoyuela se desviaron significativamente ( $P < 0,05$ ) de lo esperado por el modelo de expansión repentina. Estos dos linajes evolutivos mostraron una distribución Mismatch bimodal, que podría ser consistente con la existencia de un tamaño poblacional constante (estabilidad) (Figura IV.15). Además los valores de los cuatro test estadísticos Fu's  $FS$ , Fu and Li's  $F^*$ , Fu and Li's  $D^*$  y Tajima's  $D$  no se desviaron significativamente del modelo de neutralidad de Wright–Fisher para los linajes estudiados. Sin embargo, se detecta una señal de un posible cuello de botella en la localidad de Anchuelo, ya que los valores de Fu's  $FS$  fueron negativos y significativos ( $-2,58288$ ,  $P = 0,015$ ).

	4	1	2	9	9	1	1	1	1
		2	1	3	5	1	4	6	6
						1	9	3	8
SIG3	V	I	T	V	K	L	S	V	V
SIG1	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SIG2	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SIG4	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SIG5	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SIG6	.	.	.	.	.	.	.	.	.
SIG7	.	.	.	.	.	.	.	.	.
ANC1	I	.	.	.	.	.	.	M	.
ANC2	I	.	.	.	.	.	.	.	.
ANC3	I	T	.	.	.	.	.	.	.
ANC4	I	.	.	.	.	.	.	.	.
ANC5	I	.	.	.	N	.	.	.	.
ANC6	I	.	.	.	.	.	.	.	.
RED1	.	.	.	.	.	.	N	.	.
RED2	.	.	.	.	.	.	N	.	.
RED3	.	.	.	.	.	.	N	.	.
RED4	.	.	.	.	.	M	N	.	.
RED5	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL1	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL2	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL3	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL4	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL5	.	.	.	M	.	.	N	.	.
MOL6	.	.	.	.	.	.	N	.	.
MOL7	.	.	.	.	.	.	N	.	.
LOZ1	.	.	.	.	.	.	N	.	.
LOZ2	.	.	.	.	.	.	N	.	.
LOZ3	.	.	.	.	.	.	N	.	.
LOZ4	.	.	.	.	.	.	N	.	M
LOZ5	.	.	.	.	.	.	N	.	.
PAR1	I	.	A	.	.	.	.	.	.
PAR2	I	.	A	.	.	.	.	.	.
PAR3	I	.	A	.	.	.	.	.	.
PAR4	I	.	A	.	.	.	.	.	.
PAR5	I	.	A	.	.	.	.	.	.
SEV1	I	.	A	.	.	.	V	.	.
SEV2	I	.	A	.	.	.	V	.	.
SEV3	I	.	A	.	.	.	V	.	.

**Tabla IV.8.** Posiciones variables en la secuencia de aminoácidos codificada por el fragmento de COI amplificado en *Hormogaster elisae*. Los haplotipos se representan con la abreviatura de la localidad de la que proceden (véase Tabla IV.1). Se toma como referencia SIG3 por ser el haplotipo más frecuente de la localidad de Siguero, lugar donde se describió la especie.



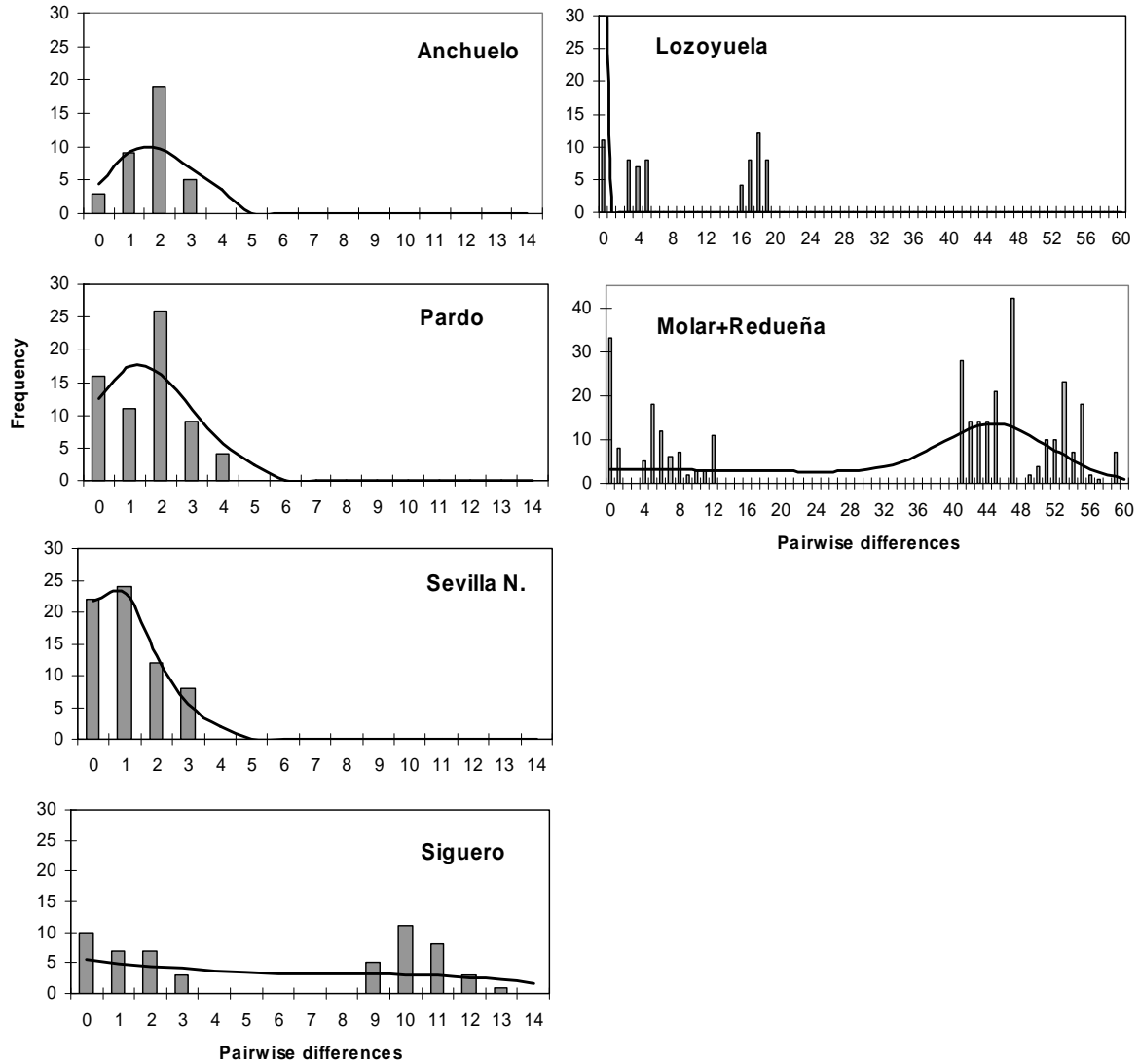


**Figura IV.14.** Cladograma generado por el algoritmo del Vecino más Próximo para las secuencias de aminoácidos. No se indican los valores de Bootstrap por ser inferiores a 50. Los haplotipos se representan con la abreviatura de la localidad de la que proceden (véase Tabla IV.1) seguida de su número.

Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva mostraron evidencia de expansiones recientes, mientras que en Sigüero la expansión fue más antigua (Tabla IV.9). Las estimas de  $\tau$  indicaron que la edad relativa de expansión de la población de Sigüero fue siete veces más antigua que la que sufrió *H. elisae* en las tres poblaciones restantes (valor medio de  $\tau = 1,7$ ). Los intervalos de confianza del 95% de  $\tau$  se solapaban al comparar Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva indicando tiempos similares desde la expansión y mostraron una distribución Mismatch unimodal consistente con un crecimiento poblacional. La distribución Mismatch de Sigüero es bimodal, lo que se puede atribuir a expansiones ocurridas en diferente momento (Figura IV.15). La estima del tiempo de expansión de Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva, fue de entre hace aproximadamente 8.200 y 23.700 años, mientras que la estima para Sigüero apunta a hace aproximadamente 130.000 años (Tabla IV.9). Así, la expansión del linaje de Sigüero (localizado en la zona de montaña) ocurrió antes, mientras que las expansiones en los linajes de Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva (localizados en la zona de valle) fueron más recientes y tienen estimas de tiempo similares.

Parámetros	Anchuelo	Pardo	Sevilla N	Sigüero
$\tau$	2,08	2,15	0,74	11,79
$\theta_0$ (por secuencia)	0,002	0,00	0,45	0,004
$\theta_1$ (por secuencia)	99999	7,45	99999	9,06
$P_{(\text{Sim. SSD} \geq \text{Obs. SSD})}$	0,08	0,22	0,91	0,26
Tiempo de expansión (años)	22.900	23.700	8.200	130.000

**Tabla IV.9.** Parámetros de genética poblacional estimados por el análisis de Mismatch bajo un modelo de expansión repentina. No se han incluido Lozoyuela y el clado Molar-Redueña porque no cumplieron las asunciones del modelo. Se calculó el tiempo en el que se produjo la expansión, a partir de los parámetros de genética de poblaciones y asumiendo una generación por año y una tasa de mutación de 3,5% por millón de años.



**Figura IV.15.** Distribuciones Mismatch para los linajes de *Hormogaster elisae*, basada en un segmento de 648 pares de bases del gen COI. La abscisa representa el número de diferencias por pares en la secuencia y la ordenada representa el número de observaciones. Las barras verticales representan la distribución de las diferencias observadas y la línea continua es la distribución esperada bajo un modelo de expansión repentina de Rogers (1995) y modificado por Schneider y Excoffier (1999).

## IV.4. Discusión

Este es el primer estudio de diversidad genética en lombrices pertenecientes a la Familia Hormogastridae, de gran importancia en los suelos mediterráneos debido a su gran biomasa. Los resultados obtenidos ofrecen una información muy valiosa que será la base para futuros estudios de la sistemática de esta Familia.

### IV.4.1. Variación de la secuencia y características morfológicas

La aplicabilidad de la secuencia del gen COI para inferir la divergencia poblacional y la estructura genética ya había sido probada previamente y se debe a su alta tasa de mutación (Halanych y Janosik 2006), lo que hace que este gen sea muy útil en estudios como el que se presenta aquí. La mayoría de las sustituciones de nucleótidos se dan, en la tercera posición del codon, lo que implica que éstas sean en su mayoría sinónimas, debido al código genético degenerado, sin cambio en el aminoácido codificado. Cuando los genes que codifican proteínas presentan mayor cantidad de sustituciones sinónimas que de no sinónimas, éstos se seleccionan negativamente (Page y Holmes 1998). En este caso, siendo el COI un gen que codifica para la subunidad de una enzima fundamental para el metabolismo (Adkins *et al.* 1996), es lógico que su estructura se mantenga estable.

Las frecuencias nucleotídicas encontradas con un valor de A+T de 59,8%, son similares a las encontradas en *L. terrestris*, por Boore y Brown (1995) con A+T de 61,6%, porcentaje que consideran de los más bajos en invertebrados.

A pesar de los valores tan altos de diversidad genética que se han encontrado (véase más adelante), se ha constatado una constancia en los caracteres morfológicos, que llevan a la conclusión clara de que todos los individuos estudiados pertenecen a la especie *H. elisae*. Esto podría indicar unos patrones de evolución morfológica y molecular discordantes o una estasis morfológica que podría ser común en invertebrados no visuales, en los que las señales químicas pueden jugar un papel más importante que la morfología en la selección sexual (Lee y Frost 2002).

#### IV.4.2. Variación inter e intrapoblacional

Este estudio revela un alto grado de heterogeneidad en la estructura genética de los Hormogastridae en el centro de la Península Ibérica.

El hecho de que los haplotipos encontrados sean exclusivos de cada localidad y no exista ningún haplotipo común, indica la existencia de un elevado grado de diferenciación genética entre las localidades analizadas. Los resultados del AMOVA lo confirman, sugiriendo la existencia de una estructura por localidades definida e indicando que la mayor parte de la variabilidad genética encontrada se debe efectivamente a diferencias entre las localidades de muestreo y una mínima parte a variación dentro de poblaciones. Además, los valores de  $\Phi_{ST}$  resultaron significativos en todas las comparaciones por pares de localidades, indicando una ausencia de flujo génico entre ellas. Además de esto, se observa que cada localidad forma su propia red de haplotipos, redes que, teniendo en cuenta el límite de parsimonia, no se conectan entre sí.

Los resultados muestran un patrón de aislamiento por distancia, en el que las localidades más alejadas geográficamente presentan distancias genéticas mayores (Wright 1943). Este tipo de patrón, asumiendo una situación de equilibrio entre la dispersión y la deriva genética, se revela mediante una correlación positiva y significativa, encontrada en el presente estudio, entre la diferenciación genética y la distancia geográfica (Slatkin 1993, Rousset 1997).

El patrón de aislamiento por distancia detectado se debe probablemente a eventos históricos. De hecho, hay una evidencia creciente de que hay muchas especies que no han llegado a este equilibrio migración-deriva y que los patrones de diferenciación genética reflejan la historia poblacional más que los niveles actuales de flujo génico (Latta y Mitton 1999, Pogson *et al.* 2001, Turgeon y Bernatchez 2001). Ya se ha visto en el capítulo III que *H. elisae* presumiblemente se mueve poco y por su naturaleza endogea es lógico pensar que tiene habilidades de dispersión limitadas. De hecho, los resultados muestran que las poblaciones están muy fragmentadas.

Las divergencias genéticas encontradas entre las localidades analizadas son en general muy altas. Field *et al.* (2007) encontraron valores igual de inusuales en *L. terrestris*, también en una escala espacial relativamente pequeña. Sin embargo, en ese estudio, se secuenciaron los genes ND2 y ND4 (NADH deshidrogenasa, subunidades 2 y 4), que evolucionan más rápido que el COI. Así, los valores medios de divergencia de las secuencias que se derivan del presente trabajo son todavía muy altos. Para entender su magnitud, se han comparado las distancias entre las localidades estudiadas (supuesta *H. elisae*) y las de ésta con otras especies del mismo género aceptadas por los especialistas y reconocibles taxonómicamente.

Se observa que la divergencia entre *H. elisae* y otras especies de *Hormogaster* es menor que la encontrada en el presente trabajo entre algunas localidades analizadas dentro la especie en estudio. Esto indica que lo que se ha llamado hasta ahora *H. elisae* podría ser un complejo de especies crípticas.

La divergencia genética entre *H. elisae* de la localidad El Pardo y *H. riojana* es de 17,45%, y entre *H. riojana* y *H. pretiosa* de Cervera del Maestre (en el sentido de Zicsi 1970) el valor es de 15,83%. Por ello, parece lógico pensar que cuando aparecen niveles de divergencia superiores a estos, nos podríamos encontrar en presencia de especies diferentes.

Teniendo en cuenta los niveles de divergencia anteriores, se observa que en muchas de las localidades muestreadas para este estudio, se podría considerar la existencia de especies distintas. Así, se podría proponer una nueva especie que reuniera las poblaciones de El Pardo y Sevilla la Nueva porque tienen una divergencia genética que oscila entre 16,75% y 20,2% con las demás poblaciones en estudio, aunque sólo difieren entre ellas en un 11%. Además, las localidades de Sigüero y Anchuelo por separado presentan también altas divergencias con el resto de localidades (más de un 13% o de un 15% respectivamente), mientras que Redueña, Lozoyuela y El Molar se podrían agrupar juntas porque muestran valores de divergencia menores, aunque entre El Molar y Lozoyuela la divergencia es algo mayor (13%). Considerando esta información, se podrían proponer por lo menos tres nuevas especies (además de la ya descrita *H. elisae* en la localidad tipo Sigüero).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que los valores de divergencia genética con otras especies descritas puede estar subestimados, ya que el análisis de un sólo individuo para *H. riojana* y *H. pretiosa* no permite cubrir toda la diversidad intraespecífica presente. Además, podría ser posible que *H. elisae* estuviese sometida por alguna razón a tasas de sustitución más altas de lo normal.

Para poder establecer conclusiones más fundadas, conviene revisar las divergencias encontradas en estudios del mismo gen en otros géneros de lombrices de tierra. Por ejemplo, Pérez-Losada *et al.* (2005), encuentran divergencias de un 31% a un 56% (valores corregidos) entre especies distintas del género *Eisenia*, mientras que las divergencias intraespecíficas, en poblaciones muy distantes (analizan muestras de *E. andrei* procedentes de Brasil, Irlanda o España) son inferiores a 0,57%. La única divergencia intraespecífica que encuentran superior a este valor es de 18%, y sugieren, basándose también en el estudio filogenético, que esa población concreta podría albergar una especie diferente no reconocida hasta el momento.

Chang y Chen (2005), encuentran divergencias intraespecíficas (valores corregidos) en *Amyntas yuhsi* (entre individuos de distintas localidades) entre el 0,2% y el 10% y en *A. formosae* entre el 2,9% y el 10,3%. Ambas especies eran consideradas sinónimas hasta ese estudio, en el que proponen separarlas, dado que su divergencia genética (12,6%) es mayor que la de algunas especies del género *Metaphire* consideradas distintas (de 10,2% a 25,5% entre especies distintas del mismo género).

Como ejemplo de estudios de otros grupos de anélidos, Ocegüera-Figueroa *et al.* (2005) encuentran divergencia intraespecífica de 4,2% a 11,9% en sanguijuelas, con valores similares a la interespecífica (14,2%), por lo que se plantean la existencia de especies crípticas. Bely y Wray (2004) estudian oligoquetos naídidos y calculan una divergencia intraespecífica de 0,2% a 11%, interespecífica de 5% a 17% e intergénero de 12% a 21%. Sugieren que las especies que presentan un 11% de divergencia intraespecífica podrían ser especies crípticas.

Es evidente que los valores estimados para distintos taxones son variables y no hay realmente un consenso sobre dónde establecer el límite, aunque parece que un valor entre 10% y 11% de divergencia ya empieza a levantar sospechas de una nueva especie

entre los autores. Si tuviéramos en cuenta este límite, tan sólo podríamos clasificar juntas a las localidades Redueña y El Molar siendo *H. elisae* un complejo de seis especies.

Chang y Chen (2005) calibran el reloj molecular de la lombriz de tierra *Metaphire yuhsi*, teniendo en cuenta los eventos geológicos conocidos que pudieron provocar el aislamiento de sus clados. Así, proponen una tasa de evolución de 3,5% por millón de años y par de bases. En nuestro caso haremos una estima con este valor dado que es el único disponible para lombrices de tierra y estas tasas pueden variar bastante de unos grupos animales a otros (Avice 1994). Así, desde la diferenciación de las localidades estudiadas podrían haber pasado desde 1,64 millones de años entre Redueña y El Molar (Pleistoceno) hasta 5,77 millones de años entre Sevilla la Nueva y El Molar (Mioceno tardío, Mesiniense). La Península Ibérica fue un refugio durante las glaciaciones del Cuaternario, lo que puede explicar que haya valores de divergencia genética tan altos que apunten a esta datación (Taberlet *et al.* 1998). El área oriental de la Península Ibérica se mantuvo como reserva de arbustos xerófilos (Pleguezuelos 1997), que justo representan el hábitat preferido por las lombrices del género *Hormogaster*. De hecho, la mayor parte de las especies de *Hormogaster* en España se distribuyen a lo largo de la costa Mediterránea.

#### IV.4.3. Relaciones filogenéticas

Las hipótesis filogenéticas generadas apoyan los datos de divergencias, ya que todas las localidades aparecen como grupos monofiléticos, excepto Redueña, que aparece como grupo parafilético en los análisis de ML y BI. Además, la alta divergencia de Sevilla la Nueva y El Pardo con el resto de poblaciones está apoyada por los árboles, en los que estas dos poblaciones se separan claramente del resto, formando un clado diferente.

La posición de los haplotipos en el árbol es congruente con la localización geográfica, lo que confirma los resultados de la red de haplotipos, donde cada población está claramente diferenciada. El parafiletismo de Redueña está motivado por la gran divergencia de uno de sus haplotipos (RED5) con el resto, lo que se puede observar también en la red, donde ese haplotipo no estaba conectado al resto de su población si se



consideraban los límites de la parsimonia. Para que Redueña fuera un grupo monofilético, habría que considerarlo junto a El Molar.

Así, en el área estudiada se encuentran seis clados genéticamente divergentes que no se superponen en cuanto a distribución, ya que cada clado corresponde a una localización diferente (El Molar y Redueña están tan sólo a 8,5 Km). Los clados de montaña aparecen más relacionados entre sí y Anchuelo (zona de valle oriental), aparece como nexo de unión entre los clados de la zona montañosa y los clados situados en la zona del valle occidental.

Wiens y Penkrot (2002) propusieron un método para delimitar especies basado en árboles de filogenia. Sugieren que si los haplotipos de una localidad no aparecen agrupados, es decir, aparecen intercalados con los de otras localidades, hay evidencia potencial de la existencia de flujo génico entre ellas y por lo tanto se trataría de la misma especie.

En este estudio, los haplotipos de cada localidad aparecen perfectamente agrupados (a pesar de que Redueña no constituye un grupo monofilético y habría que agruparlo con El Molar), por lo que se podría decir que *H. elisae* es un complejo de seis especies, coincidentes con los seis linajes evolutivos encontrados. Sin embargo, en el árbol de aminoácidos los haplotipos de Redueña, Molar y Lozoyuela aparecen intercalados, lo que indica que al menos a este nivel se podría hablar del mismo grupo. En cualquier caso, precisamente el uso del ADN mitocondrial está tan extendido porque puede detectar la formación de nuevas especies mucho antes que con el ADN nuclear (Wiens y Penkrot 2002) o con otras técnicas, por ello, aunque el árbol de aminoácidos es informativo, no se debe olvidar la resolución que ofrece el árbol de ADN.

Es difícil tomar una decisión clara acerca del límite de especie para las poblaciones estudiadas a partir de estos datos. Sería interesante explorar toda el área de distribución de una forma más detallada para asegurar que las discontinuidades genéticas encontradas están delimitando realmente especies crípticas y no son un artefacto de un muestreo discontinuo. Eso es lo que se hace en el capítulo V con *H. elisae* y en el VI con toda la Familia.

Los agrupamientos que se obtienen teniendo en cuenta los datos de longitud no coinciden exactamente con los grupos que se obtienen teniendo en cuenta la semejanza genética, por lo que las diferencias de tamaño podrían deberse a factores genéticos pero también a condiciones ambientales o a una combinación de ambas cosas. Así, sería conveniente estudiar las características del suelo en cada localidad y el crecimiento de individuos de diferentes poblaciones en el mismo suelo. De esta forma, sería posible elucidar las causas de las diferencias de tamaño observadas.

#### IV.4.4. Historia demográfica

En una valoración cualitativa de la demografía, se detecta que los clados de Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva (localizados en la zona de la Depresión) tienen altos niveles de diversidad haplotípica  $H$  y bajos de diversidad nucleotídica  $\pi$ , lo que es una señal de una expansión demográfica a partir de un tamaño efectivo de la población pequeño, reteniendo nuevas mutaciones (Avise *et al.* 1984, Watterson 1984), lo que está en muchos casos relacionado con episodios de oscilaciones climáticas. Sin embargo, los clados restantes procedentes de la Sierra de Guadarrama tienen valores altos tanto de  $H$  como de  $\pi$  (sus haplotipos estaban más dispersos en la red), lo que es característico de poblaciones estables. El clado formado por El Molar y Redueña, localizado en la parte media y cara sur de la Sierra de Guadarrama, podría haber sufrido un proceso de contacto secundario entre linajes alopátridos previamente diferenciados, ya que muestra gran diferenciación entre sus haplotipos, con RED5 separado del resto de haplotipos tanto en la red como en los árboles generados por los análisis de ML y BI.

El clado más interno en la red de haplotipos y por ello la población más antigua podría ser Siguero, localidad tipo de *H. elisae*. La dispersión pudo ocurrir a partir de uno de los dos linajes que aparecen en Siguero pero a partir de dos grupos separados, como muestra la bimodalidad de la distribución Mismatch. Un grupo de individuos podría haber originado las poblaciones de montaña (Molar-Redueña y Lozoyuela) y un segundo habría dado lugar al resto de las poblaciones situadas en la Depresión (El Pardo, Sevilla la Nueva y Anchuelo). El Pardo y Sevilla la Nueva están localizados en el límite occidental del área de distribución de los Hormogastridae, por lo que sería probable que estas poblaciones resultaran de eventos de colonización posteriores. Sin embargo, como se indicó anteriormente, un muestreo más exhaustivo a lo largo de toda

el área de distribución de los Hormogastridae podría revelar niveles adicionales de heterogeneidad y una estructuración poblacional que permitan comprender mejor los procesos evolutivos y de colonización de este grupo de lombrices de tierra.

Según las divergencias genéticas, parece que la diferenciación de los grupos se dio en un tiempo comprendido entre el Mioceno tardío y el Pleistoceno temprano, pero que sus genealogías de ADN mitocondrial coalescen en una escala más reciente de alrededor de pocos miles de años. Las estimas de la expansión para las dos regiones geográficas estudiadas (Sierra y Depresión) mostraron dataciones distintas. De esta forma, la expansión de los clados de la Depresión (Anchuelo, El Pardo y Sevilla la Nueva) pudo tener lugar en el Pleistoceno tardío, anterior a la glaciación más reciente (hace 18.000 años). En aquel momento la región ya estaba configurada tal y como se conoce actualmente y el clima estaba bien establecido (Blondel y Aronson 1999).

Además de las distribuciones Mismatch, que se basan en las diferencias entre pares de secuencias, existen otros estadísticos basados en la tasa de mutación (sitios polimórficos), y frecuencia y distribución de los haplotipos, que se han mostrado útiles para detectar eventos de crecimiento de la población (Ramos- Onsins y Rozas 2002). La existencia de procesos de expansión de los clados en el área estudiada no está bien soportada por estos estadísticos, ya que sólo el estadístico Fu's *FS* muestra valores significativos en el clado de Anchuelo. El hecho de que estos estadísticos no corroboren la expansión se podría deber a la existencia de diferentes intensidades en la misma, a que tuviera lugar en diferentes momentos, o a la actuación de otros procesos evolutivos que operan dentro de la selección natural.

#### **IV.4.5. Conclusiones**

En resumen, se ha estudiado la diversidad genética de *H. elisae* en el centro de la Península Ibérica y todos los individuos capturados se pueden atribuir a esta especie por sus caracteres morfológicos. Sin embargo, el análisis de diversidad del ADN mitocondrial ha mostrado que hay una diversidad genética muy alta entre las poblaciones analizadas, lo que podría estar indicando que *H. elisae* es en realidad un complejo de especies compuesto por al menos cuatro especies crípticas. La primera incluiría las poblaciones de El Molar, Redueña y Lozoyuela, la segunda comprendería

individuos de El Pardo y Sevilla la Nueva, la tercera estaría representada por Anchuelo y la cuarta sería la originalmente descrita como *H. elisae*, en Siguero.

Los resultados del estudio que revelan la existencia de seis linajes evolutivos diferentes dentro de la especie, muestran que sería adecuado profundizar en el estudio filogeográfico para confirmar si esos linajes podrían estar representando especies diferentes. En el capítulo V de esta memoria se aporta más información para abordar este aspecto.

Los resultados indican que quizás la sistemática de esta especie basada exclusivamente en caracteres morfológicos no es capaz de dar una respuesta a la gran variabilidad genética observada, o que la evolución morfológica de este complejo de especies está estancada y se están originando nuevas especies sin una correspondencia morfológica clara a esta diversificación. Por ello, la biología molecular se torna esencial para entender la variabilidad y detectar especies crípticas en este grupo.

Otra cosa muy diferente es describir y nominar estas nuevas “especies”, ya que el resultado final dependerá mucho del concepto de especie que se utilice. En principio el concepto de especie biológico parece el seguido por una gran mayoría de autores, y para poder aplicarlo en este caso concreto sería necesario conocer si las diferentes especies crípticas son capaces de hibridar entre sí. Por esta razón, se está considerando en nuestro equipo de investigación la realización de un experimento de cruzamiento entre ejemplares de *H. elisae* de distintas localidades para comprobar si su reproducción es posible, y si los híbridos son viables o existe alguna barrera que no permita definir la especie como especie biológica. Estos experimentos forzosamente serán largos y complicados, dado el ciclo biológico de *H. elisae*, que no se reproduce hasta aproximadamente un año de vida y presenta largos periodos de incubación (Díaz Cosín *et al.* 2009). Hay que señalar además que *H. elisae* se reproduce en cautividad con mucha dificultad y produce muy pocos capullos, aunque ya hemos desarrollado las técnicas para conseguir esta reproducción de forma estable.



**V. Especiación críptica de hormogástridos revelada por datos  
mitocondriales y nucleares**



## **V. Especiación críptica de hormogástridos revelada por datos mitocondriales y nucleares.**

(Publicación: Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2010) Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 507-512.)

### **RESUMEN**

La delimitación de especies de lombrices de tierra ha sido difícil de determinar con certeza, debido a su simplicidad estructural. Este capítulo se centra en las lombrices de la Familia Hormogastridae, un grupo clave para el sistema edáfico Mediterráneo, procedentes del centro de la Península Ibérica. Se han secuenciado fragmentos de los genes mitocondriales COI, 16S y tRNAs<sub>Leu-Ala-Ser-Leu</sub> y el gen nuclear 28S en 202 individuos recogidos en 16 localidades de esta área, incluyendo tres grupos externos. Los resultados sugieren un único evento de colonización de los hormogástridos en el área central de la Península Ibérica que ha llevado a una constancia morfológica de los especímenes y a una alta diversidad genética. Los genes mitocondriales y nucleares coincidieron al indicar la presencia de al menos cinco especies crípticas alopátricas en el área estudiada. Un patrón de aislamiento por distancia sugiere que la distribución actual podría haber surgido por una colonización progresiva en el pasado a partir de ese origen único y una fragmentación de las poblaciones a lo largo de mucho tiempo, debido a la escasa capacidad de dispersión de las lombrices de tierra endogeas. Se encontró una correlación positiva entre algunas propiedades del suelo (arena gruesa y limo total) y las distancias genéticas, lo que podría indicar que estas poblaciones han sido modeladas genéticamente, pero no morfológicamente, por el ambiente.



## ABSTRACT

Species delimitation of earthworms has been difficult to determine with certainty due to their structural simplicity. This study focused on earthworms of the family Hormogastridae, a key group for the Mediterranean soil system, from the central Iberian Peninsula. We sequenced fragments of mitochondrial genes COI, 16S and t-RNAs<sub>Leu-Ala-Ser-Leu</sub> and the nuclear gene 28S for 202 individuals from 16 localities within this area, including three outgroup taxa. The results suggest a single colonization event of hormogastrids in the central Iberian Peninsula that lead to a morphological constancy of the specimens and a high genetic diversity. Mitochondrial and nuclear genes agreed in indicating the presence of at least five cryptic allopatric species within the study area. A pattern of isolation by distance suggested that the present distribution could have arisen from diffusive spread colonization in the past from the mentioned single origin and a high fragmentation of populations over a long period due to the scarce dispersal capacity of endogeic earthworms. A positive correlation was found between some soil properties (coarse sand and total loam content) and genetic distances, which indicates that these populations could have been shaped genetically, but not morphologically, by the environment.

## V.1. Introducción

La existencia de especies difíciles de distinguir fue discutida en primer lugar por Mayr (1948), que lo usó como su principal argumento contra el concepto morfológico de especie (Mayr 1963). Más recientemente, el incremento del uso de datos moleculares en estudios taxonómicos ha llevado a un descubrimiento en progresión geométrica de especies crípticas, especialmente dentro de grupos de invertebrados (Müller 2000, Pfenninger *et al.* 2003, Stocks *et al.* 2005, Hogg *et al.* 2006, Tully *et al.* 2006, Challis *et al.* 2007, Finston *et al.* 2007) y también específicamente en anélidos, como sanguijuelas (Bely y Weisblat 2006), oligoquetos de agua dulce (Gustafsson *et al.* 2009) y lombrices de tierra (Chang *et al.* 2008, King *et al.* 2008). Así, el estudio de la variación críptica se ha convertido en un tema muy importante para la biología evolutiva (McGuigan y Sgrò 2009).

La taxonomía clásica de lombrices de tierra se ve muy limitada debido a la simplicidad estructural de estos animales y porque los caracteres de diagnosis pueden ser muy variables y superponerse entre taxones (Pop *et al.* 2003). Además, ha sido difícil decidir si un carácter es ancestral o evolucionado, ya que el registro fósil de estos invertebrados es escaso (Pearce *et al.* 1990) debido a sus cuerpos de naturaleza blanda. Como consecuencia, la morfología por sí sola no puede determinar los límites de especies en algunas lombrices de tierra. Cuando estas técnicas tradicionales son limitantes, la taxonomía basada en ADN y herramientas moleculares asociadas podrían ser el único modo de sacar a relucir el nivel real de biodiversidad (Proudlove y Wood 2003).

Charles Darwin describió las lombrices de tierra como el grupo animal más importante en la historia del mundo (Darwin 1881) porque juegan un papel clave en muchos procesos del suelo, manteniendo la fertilidad del mismo y siendo una parte importante en las cadenas de alimentación (Edwards y Bohlen 1996). Por esta razón, la delimitación de especies de lombrices de tierra es particularmente importante. Actualmente se está trabajando mucho en temas de ecología aplicada y biología de lombrices de tierra (Lavelle y Spain 2001, Edwards 2004) y sin poder establecer los

límites adecuados de especies, los resultados de todos estos estudios podrían ser confusos.

Como se ha comentado en la Introducción de esta memoria, la Familia Hormogastridae, consiste en cuatro géneros y 22 especies de lombrices de tierra de tamaño mediano y grande. El género *Hormogaster*, Rosa 1887, concentra la mayor diversidad de esta Familia y contiene 18 especies, 16 de las cuales se encuentran en la región nordeste de la Península Ibérica y sólo una de ellas, *Hormogaster elisae*, Álvarez (1977), es endémica de su área central. Es sorprendente que con la alta diversidad de especies que se encuentra en la zona nordeste, este género esté representado por una única especie en el área central, lo que dado el muestreo intensivo realizado en esta zona difícilmente podría ser el resultado de estudios limitados o de una falta de muestreo.

En el capítulo anterior, se encontró una alta divergencia entre poblaciones de *H. elisae* en el área central de la Península Ibérica, que podría estar sugiriendo la presencia de diferentes especies crípticas coexistiendo en este área. La única diferencia morfológica aparente observada fue el tamaño de los individuos, que no se correspondió con las agrupaciones propuestas por el análisis del gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI). Dada la naturaleza preliminar del estudio realizado en el capítulo IV, se plantea como necesario investigar con mayor profundidad este problema y desentrañar los niveles reales de biodiversidad de lombrices de tierra hormogástridos en el área central de la Península Ibérica.

En el presente capítulo se ha realizado un mayor esfuerzo de muestreo y se han analizado más regiones del genoma. Una única región de ADN (DeSalle *et al.* 2005) o un nivel arbitrario de divergencia (Avise 2000) no puede determinar los límites entre especies por sí mismos. La unión de datos procedentes de fuentes alternativas, como genes nucleares, debería usarse complementando la información del ADN mitocondrial para dilucidar estos límites (King *et al.* 2008). Por esta razón en este capítulo se incluyen los dos marcadores moleculares propuestos como los más informativos para delimitar límites entre especies mediante códigos de barras de ADN, es decir, COI (Hebert *et al.* 2003a, 2004a, 2004b, Barrett y Hebert 2005) y el ADN ribosómico 16S (Blaxter 2004), y también el gen nuclear ribosómico 28S. Esta última región ha

mostrado tener mayor resolución a niveles taxonómicos superiores (Pérez-Losada *et al.* 2005, 2009) y por ello, la presencia de variabilidad en ella supondría una confirmación robusta de la especiación críptica propuesta en el capítulo IV.

En este capítulo también se ha estudiado si esta alta diversidad genética se ve influenciada por los factores del suelo o si responde a eventos históricos. Finalmente, se ha examinado si las variaciones encontradas en el tamaño de los especímenes son consecuencias de condiciones diferentes en el suelo (es decir, plasticidad fenotípica) o si están relacionadas con la evolución genética.

## **V.2. Materiales y métodos**

### **V.2.1. Muestreo y estudio morfológico**

Se recogieron un total de 202 individuos maduros de hormogástridos mediante muestreo manual con azadas, en 16 localidades diferentes del centro de la Península Ibérica (incluyendo la localidad típica de la especie *H. elisae*: Sigüero, Álvarez (1977), Tabla V.1). Siete de las poblaciones se corresponden con las estudiadas en el capítulo anterior. La selección de los lugares de muestreo se basó en estudios previos (Moreno 1981, Garvín 1995, Garvín *et al.* 2002, Jesús *et al.* 2002) y en nuevas exploraciones de la zona. Se intentaron localizar más poblaciones en la parte meridional del área de muestreo pero la mayor densidad de estas lombrices de tierra resultó localizarse al norte. De forma adicional, se recogieron tres especies diferentes de Hormogastridae: *Xana omodeoi* Díaz Cosín *et al.*, 1989 (San Román, Asturias), que se utilizó como grupo externo) y *H. riojana* Qiu y Bouché, 1998 (Alesanco, La Rioja) y *H. pretiosa* Michaelsen, 1899 (en el sentido de Zicsi (1970) de Cervera del Maestre, Castellón de la Plana) como referencias de *Hormogaster* procedentes de localidades distantes de la Península Ibérica (Figura V.1). Los individuos se lavaron con agua destilada y se conservaron en alcohol absoluto a -20°C. Se tomó una porción del tegumento (0,025 g) que se limpió cuidadosamente bajo la lupa para eliminar partículas de suelo y parásitos macroscópicos. A continuación, las muestras de tegumento se rehidrataron y se conservaron a -80°C hasta la extracción de ADN. Los especímenes se diseccionaron y se procedió a un análisis morfológico, prestando especial atención a las características

que más contribuyen a la sistemática de los Hormogastridae según Qiu y Bouché (1998).

Localidad	Abr.	NCOI	N16S-tRNAs	N28S	Localización GPS	Altitud (m)
Anchuelo	ANC	9	6	2	N40°28'50,2'' W3°14'33,5''	780
Boadilla del Monte	BOA	12	6	2	N40°25'50,2'' W3°55'30,9''	667
Cabrera	CAB	12	6	2	N40°51'25,9'' W3°37'18,2''	1029
Cubillo de Uceda	UCE	12	6	2	N40°49'38,7'' W3°25'19,5''	883
Fresno del Torote	FRE	2	2	2	N40°35'51,8'' W3°24'42,0''	660
Lozoyuela	LOZ	22	7	2	N40°56'51,9'' W3°37'16,2''	1036
Molar	MOL	12	11	2	N40°44'22,9'' W3°33'53,1''	753
Navas de Buítrago	NAV	12	6	2	N40°56'21,0'' W3°35'38,1''	994
Paracuellos del Jarama	JAR	12	6	2	N40°30'36,9'' W3°31'59,1''	674
Pardo	PAR	12	2	2	N40°31'11,0'' W3°47'42,7''	662
Redueña	RED	26	6	2	N40°48'46,7'' W3°36'06,2''	797
Sevilla la Nueva	SEV	12	6	2	N40°20'41,9'' W4°00'48,9''	644
Siguero	SIG	11	6	2	N41°11'06,1'' W3°37'07,4''	1073
Soto del Real	SOT	12	6	2	N40° 46'30,5'' W3°46'42,6''	985
Tres Cantos	TRE	12	6	2	N40° 36'46,9'' W3°40'41,1''	675
Venturada	VEN	12	6	2	N40° 48'07,7'' W3°37'19,6''	890

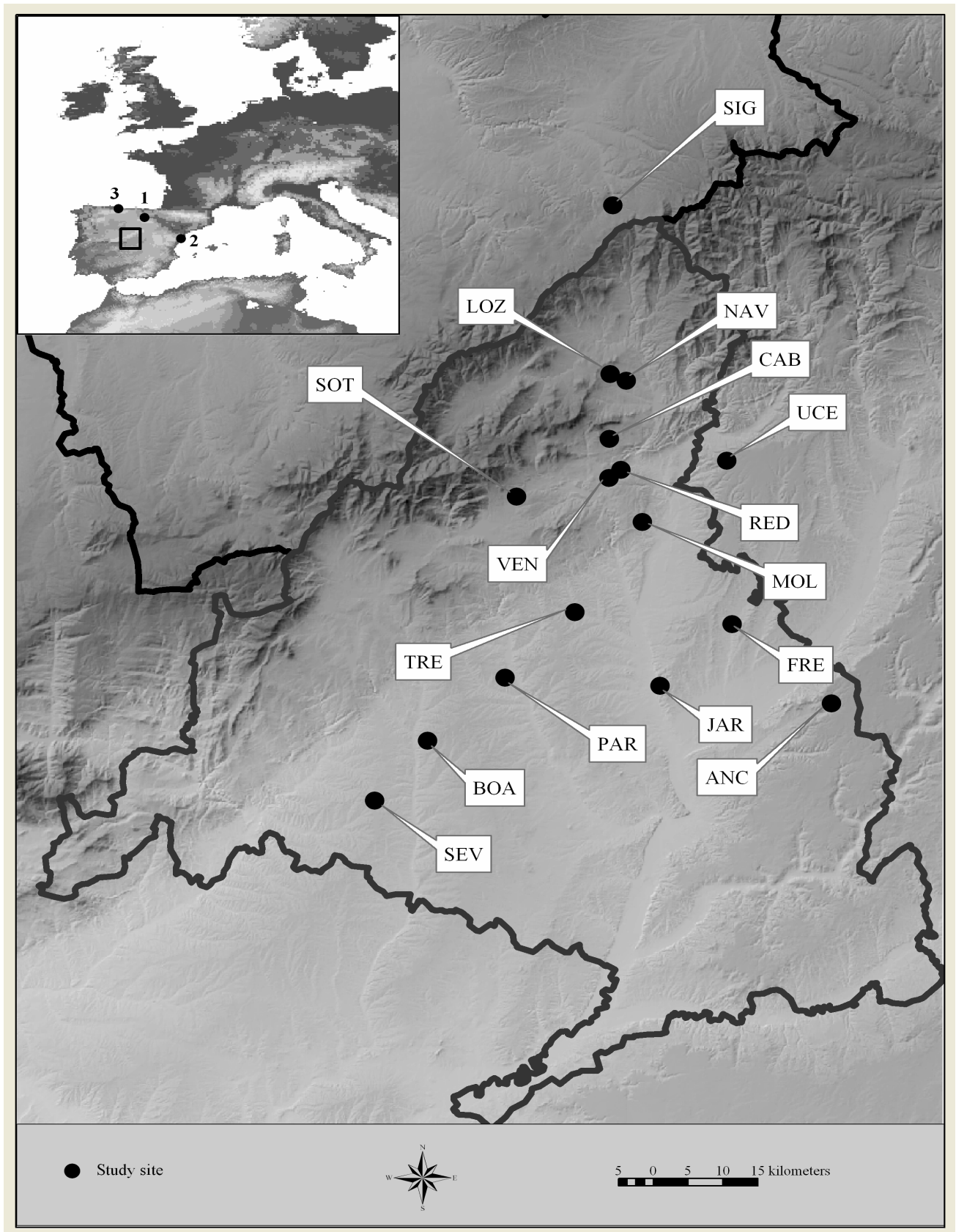
**Tabla V.1.** Localidades de muestreo de hormogástridos en el área central de la Península Ibérica y número de individuos secuenciados para cada gen (N). Se muestran las abreviaturas usadas en los análisis de datos (Abr.).

## V.2.2. Evaluación de factores ambientales

Se midieron algunos factores del suelo en las localidades muestreadas con el objetivo de explorar la relación entre ellos y las diferencias de tamaño encontradas entre las lombrices, y también para estudiar si la diversidad genética se debía a diferencias en el medio. Estos factores se seleccionaron porque figuran en la bibliografía entre los que más afectan a la distribución de las lombrices de tierra (Hernández *et al.* 2003, Edwards y Bohlen 1996).

Se determinaron la textura del suelo y el pH como se describe en Guitián y Carballas (1976). El contenido total en nitrógeno se determinó mediante el método de Kjeldahl como se indica en Page *et al.* (1982) y se expresó en porcentaje. El análisis de carbono orgánico oxidable se basó en el método de Anne (1945), adaptado para un lector de microplacas (Microplate Biorad, 590 nm), en el que se utilizó glucosa como estándar y expresando los resultados en porcentaje.

Se implementó un test de Mantel (1967) en ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para estudiar la correlación entre las distancias genéticas del gen más variable, COI con las diferencias de los factores del suelo y de tamaños corporales entre localidades (en valor absoluto). Los valores de significación de las correlaciones entre matrices se evaluaron con 10.000 permutaciones. Se realizó un análisis de regresión múltiple para evaluar la relación entre los factores del suelo y la talla de las lombrices (STATISTICA v. 6.1, StatSoft, Inc. (2001), <http://www.statsoft.com>).



**Figura V.1.** Mapa en el que se muestran los puntos de muestreo de hormogástridos en el área central de la Península Ibérica. Véanse en la Tabla V.1 los nombres completos de las localidades. En el mapa representado en la parte superior izquierda se representan los grupos externos de la siguiente manera: 1: *H. riojana*; 2: *H. pretiosa* (en el sentido de Zicsi (1970)); 3: *X. omodeoi*.

### V.2.3. Extracción de ADN, amplificación de genes y secuenciación

Se aisló el ADN genómico total a partir de las muestras de tegumento utilizando el kit comercial DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, IZASA, Barcelona, Spain). Se amplificaron fragmentos de los genes mitocondriales COI, 16S y tRNA Leu, Ala, Ser and Leu y del nuclear 28S con ayuda de los cebadores que se muestran en la Tabla V.2 y las condiciones mostradas en la Tabla V.3. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador de la marca Perkin Elmer 9700. En la Tabla V.1 se muestra el número de individuos analizados para cada gen. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tinción con bromuro de etidio y se purificaron usando el kit comercial SPEEDTOOLS PCR clean-up kit (Biotools, Madrid, Spain). La secuenciación se realizó en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Servicio Central de la UCM). Las secuencias obtenidas se compararon en GenBank mediante el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.* 1997) y se alinearon con CLUSTALX (Thompson *et al.* 1997).

### V.2.4. Análisis de datos

#### V.2.4.a. Análisis de genética de poblaciones

Las estimas de variabilidad se calcularon con los programas ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) y DnaSP v. 4.5 (Librado y Rozas 2009). La variación dentro de poblaciones se expresa como diversidad haplotípica ( $H$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y número de posiciones polimórficas ( $S$ ). La diferenciación genética media entre y dentro de las poblaciones se estimó utilizando el modelo de evolución de secuencia de Kimura 2-parámetros (1980) con el objeto de comparar estos resultados con los obtenidos en estudios previos de lombrices de tierra. Se calcularon los valores de  $\Phi_{ST}$  por pares, teniendo en cuenta la variación en las frecuencias de haplotipos entre poblaciones y la distancia genética basada en variación nucleotídica. Se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA; Weir y Cockerham 1984, Excoffier *et al.* 1992) expresada con estadísticos  $\Phi$  para estudiar la estructura poblacional. Las estimas de los intervalos de confianza se determinaron comparando los estadísticos  $\Phi$  observados con una distribución de estimas generada a partir de 1.000 permutaciones de los datos (Excoffier *et al.* 1992).



Región amplificada	Secuencia del cebador (5'-3')	Referencia	Posición
COI	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	LCO1490 (Folmer,1994)	65-712 <i>Lumbricus terrestris</i> (Boore y Brown, 1995)
	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	HCO2198 (Folmer 1994)	U24570
16S tRNAs	CGACTGTTTAACAAAAACATTGC	16S-tRNA-Leu-Ala-Ser-Leu- LumbF2 (Pérez-Losada <i>et al.</i> 2009)	11669-12464 <i>Lumbricus terrestris</i> (Boore y Brown, 1995)
	GCACTATTCTGCCAYCTTGT	Ho_16sRa (en este estudio)	U24570
28S	GAGTACGTGAAACCGTCTAG	28S-F1 (Pérez-Losada <i>et al.</i> 2009)	338-1076 <i>Eisenia fetida</i> (Pérez-Losada <i>et al.</i> 2005)
	CGTTTCGTCCCAAGGCCTC	28S-R1 (Pérez-Losada <i>et al.</i> 2009)	AY874486.1

**Tabla V.2.** Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar los fragmentos de los genes utilizados en este estudio y posición relativa de estos fragmentos en otras especies de lombrices de tierra estudiadas. Se indica el número de acceso de esas secuencias en la base de datos GenBank.

Región amplificada	Desnaturalización de ciclo	Temperatura de unión del cebador	Extensión de ciclo	N. de ciclos	Tampón	Mg <sup>++</sup> (mM)	dNTPs (mM)	Cebadores (μM)	Enzima (u/μl)
COI	95°C 30 seg	50°C 45 seg	72°C 1 min	40	1x	3,5	0,4	0,4	0,025
16S-tRNAs	95°C 30 seg	60°C 1 min	72°C 90 seg	35	1x	3	0,8	1	0,04
28S	95°C 45 seg	54,5°C 1 min	72°C 90 seg	40	1x	2,5	1	0,7	0,035

**Tabla V.3.** Condiciones de la reacción de PCR para los diferentes fragmentos utilizados en este estudio. Se indica la concentración necesaria de los diferentes reactivos. La desnaturalización inicial se realizó en todos los casos a 95°C durante 3 minutos y la extensión final a 72°C durante 5 minutos. Mg<sup>++</sup>: Concentración de Magnesio.

Finalmente, se exploró la correlación entre distancias genética y geográfica ( $\Phi_{ST}$  con la corrección de Kimura 2-parámetros para el gen COI y la línea recta entre puntos de muestreo) con un test de Mantel (1967) implementado en el programa IBD, *Isolation by distance* (Jensen *et al.* 2005). La significación de la correlación entre las matrices se evaluó mediante comparaciones del estadístico Z, para el que se obtuvieron distribuciones aleatorias con 10.000 permutaciones.

#### **V.2 4.b. Redes de haplotipos**

Se construyeron redes de haplotipos para cada región génica usando el procedimiento de la parsimonia estadística (Templeton *et al.* 1992, Crandall *et al.* 1994) y un límite de conexión al nivel de parsimonia del 95% con el programa TCS v.1.21 (Clement *et al.* 2000). Para el gen COI, debido al gran número de haplotipos encontrados y a las altas divergencias entre ellos, la red se construyó excluyendo las terceras posiciones del codon, que fueron más variables, y su secuencia completa se analizó también con SPLITSTREE4 v.4.10 (Huson y Bryant 2006), que permite una estima mejor para altas divergencias. Para ello, se utilizó la configuración predeterminada.

#### **V.2.4.c. Relaciones filogenéticas**

Todos los análisis filogenéticos se realizaron de forma separada para cada una de las tres particiones (COI, 16S-tRNA, 28S) y también para la secuencia concatenada. Se utilizó GBLOCKS (Talavera y Castresana 2007) para eliminar aquellas posiciones que no podían ser alineadas sin ambigüedades.

Se evaluó la congruencia entre las particiones usando el protocolo de Wiens (1998) y bajo el criterio de parsimonia usando el test de ILD (Farris *et al.* 1994) como está implementado en el programa WINCLADA v.1.00.08 (Nixon 2002). Se llevaron a cabo búsquedas heurísticas en 100 pseudoréplicas con cinco repeticiones de unión aleatoria de taxones (random addition of taxa) guardando los árboles generados por repetición hasta un máximo de 10 árboles.

Se utilizó el programa JMODELTEST v.0.1.1 (Posada 2008) para seleccionar el modelo evolutivo que mejor explicaba los datos. Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike 1973) para seleccionar entre los modelos disponibles.

Se realizó una estima de la filogenia mediante inferencia bayesiana (BI) utilizando el programa MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para la matriz concatenada, se especificaron los modelos de sustitución de nucleótidos seleccionados por JMODELTEST para cada partición y se permitió que las estimas de sustitución variasen de forma independiente en cada partición. El soporte de los clados se estimó utilizando el algoritmo de Monte Carlo a partir de simulaciones de cadenas de Markov. Los parámetros en MRBAYES se fijaron a cuatro millones de generaciones y muestreo cada generación 500, obteniendo 8.000 árboles, utilizando la configuración por defecto de empezar el análisis con un árbol aleatorio. El análisis se realizó dos veces y se desecharon como “burn in” todos los puntos de muestreo anteriores a la fase de estabilización. El resto de los árboles se combinaron para encontrar la estima de la filogenia con máxima probabilidad *a posteriori*. Como se detectó un patrón de saturación en las terceras posiciones del codon de COI usando el programa DAMBE (Xia y Xie 2001), el árbol fue construido también sin estas posiciones, pero los resultados fueron los mismos.

Los análisis de Máxima Verosimilitud (Maximum-likelihood, ML) se llevaron a cabo en el programa PHYML v.2.4.4 (Guindon y Gascuel 2003), incluyendo los valores de  $\alpha$  e I que generó JMODELTEST.

Los árboles de máxima parsimonia (Maximum Parsimony, MP) fueron inferidos usando el programa TNT v.1.1 (Goloboff *et al.* 2003). Se realizaron búsquedas heurísticas con 1.000 repeticiones de unión aleatoria de taxones (random addition of taxa) guardando 10 árboles por repetición hasta un total de 10.000 árboles. Los mejores árboles se sometieron a una vuelta adicional de cambio de ramas mediante TBR (Tree Bisection and Reconnection). El soporte de los clados bajo las aproximaciones de ML y MP se evaluó mediante el procedimiento estándar de Bootstrap (Felsenstein 1985) con 1.000 pseudoréplicas.

### V.3. Resultados

#### V.3.1. Características morfológicas

Todos los individuos estudiados fueron consistentes en una serie de características únicas para *H. elisae* que separa fuertemente esta especie del resto de especies del género *Hormogaster*. Véase en el capítulo IV una descripción detallada de estos caracteres, que en resumen son: posición del clitelo en los segmentos (13)14(15)-26(27)28, posición de los tubérculos pubertarios en 22(23)–25(26), presencia de dos pares de espermatecas tubulares en los segmentos 9 y 10, siendo el par en 10 mucho mayor y la existencia de un tiflosol con cinco láminas longitudinales durante un mínimo de 30 ó 40 segmentos. Se han detectado ligeras variaciones en los patrones de papilas para algunas localidades, pero debido a que éste es un carácter muy variable incluso dentro de poblaciones, se requieren más estudios para examinar estas tendencias.

A pesar de esta constancia morfológica en todas las poblaciones muestreadas, de nuevo se encontraron diferencias significativas al comparar la longitud de los especímenes (ANOVA,  $F_{12,98} = 29,801$ ,  $P < 0,001$ ). Cabrera, Fresno del Torote y Venturada se excluyeron del análisis debido a su pequeño número de muestras. Al igual que en el capítulo anterior, los especímenes más grandes se encontraron en Sigüero (22,7 cm), y los de menor longitud resultaron ser los de Lozoyuela (7,95 cm; Tabla V.4). Las comparaciones a posteriori demostraron que se podían establecer tres grupos de tamaño: (I) Sigüero y Pardo; (II) Lozoyuela; y (III) el resto de las poblaciones. A pesar de esto, todos los especímenes exhibieron características clave para la taxonomía de las lombrices de tierra que correspondían a *H. elisae*.

#### V.3.2. Relaciones entre distancias genéticas y tamaño corporal o propiedades del suelo

Las características del suelo se muestran en la Tabla V.4. La textura del suelo en la mayoría de las muestras resultó ser Franco-arenosa. Los test de Mantel indicaron la presencia de correlaciones significativas entre las distancias genéticas calculadas con el gen COI y la diferencia en los valores de porcentaje de arena gruesa ( $r=0,271$ ,  $P=0,024$ )

y porcentaje de limo total ( $r=0,273$ ,  $P=0,026$ ). No se encontraron correlaciones significativas del tamaño de las lombrices con las distancias genéticas ni con las propiedades del suelo.

### **V.3.3. Características de la secuencia y diversidad genética**

Para el gen COI, se secuenció un fragmento de 648 pares de bases en 202 individuos. No se observaron inserciones ni deleciones. Se detectaron un total de 230 posiciones polimórficas y 361 mutaciones, indicando un alto grado de polimorfismo. Se encontraron 80 haplotipos exclusivos de localidad, por lo que no hubo haplotipos compartidos entre localidades (Números de acceso de GenBank EF653868-EF653905, GQ409661-GQ409702). El número de haplotipos por localidad se encontró en un rango de uno a nueve (Tabla V.5). Los valores globales de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron  $H=0,98$  y  $\pi=0,128$  respectivamente, y los valores para cada localidad se muestran en la Tabla V.5.

Para el fragmento 16S-tRNA el alineamiento resultó en 851 posiciones, que se redujeron a 800 cuando se excluyeron los gaps. Se encontraron 200 posiciones polimórficas y 275 mutaciones y un total de 51 haplotipos entre los 94 individuos incluidos en el análisis, todos exclusivos de localidad (Números de acceso de GenBank GQ409704-GQ409754) El número de haplotipos por localidad se encontró en un rango de uno a seis (Tabla V.5). Los valores totales de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron  $H=0,98$  y  $\pi=0,072$  respectivamente, y los valores para cada localidad se muestran en la Tabla V.5.

Para el gen nuclear 28S, se secuenció un fragmento de 739 pares de bases en 32 individuos. No se observaron inserciones ni deleciones. Se encontraron solo seis haplotipos distintos (Números de acceso de GenBank GQ409652-GQ409657) que en ocasiones estaban compartidos entre localidades (véase la sección de las redes de haplotipos). Se detectaron un total de 15 posiciones polimórficas y 16 mutaciones. Los valores totales de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron  $H=0,63$  y  $\pi=0,005$  respectivamente.

Los números de acceso de GenBank para *H. riojana*, *H. pretiosa* y *X. omodeoi* son EF653906-EF653907 y GQ409703 (COI), GQ409755-GQ409757 (16S), GQ409658-GQ409660 (28S).

#### V.3.4. Divergencia genética y estructura poblacional

Los valores de divergencia genética calculados para los fragmentos de genes mitocondriales se muestran en la Tabla V.5 (dentro de las poblaciones) y en la Tabla V.6 (entre poblaciones). Se incluyen los valores de divergencia con especies externas para proporcionar un punto de referencia. Las divergencias encontradas entre localidades de *H. elisae* en centro de la Península Ibérica fueron generalmente altas, oscilando entre 1,45% (COI) o 0,44% (16S-tRNA; entre Paracuellos del Jarama y Venturada) y 22,06% (COI; entre Boadilla del Monte y Cubillo de Uceda) o 13,74% (16S-tRNA; entre Boadilla del Monte y Siguero). Los valores mínimos de divergencia que se encontraron entre especies diferentes fueron de 15,83% entre *H. riojana* y *H. pretiosa* o de 17,45% entre *H. riojana* y la población del Pardo para el gen COI y de 6,62% entre *H. riojana* y *H. pretiosa* o de 12,19% entre *H. riojana* y la población de Anchuelo para el fragmento génico 16S-tRNA. Es sorprendente que estos valores fueron a veces menores que aquellos encontrados entre algunas localidades de la putativa *H. elisae* en el centro de la Península Ibérica, lo que hace posible la hipótesis de que haya diferentes especies dentro de este área. Es también destacable que las divergencias entre las poblaciones de la supuesta *H. elisae* y *X. omodeoi* fueron similares o incluso menores (en el caso del fragmento 16S-tRNA) al compararlas con las encontradas entre estas poblaciones de *H. elisae* y otras especies del mismo género *H. riojana* y *H. pretiosa*.

Los resultados del AMOVA exhibieron un alto grado de estructuración poblacional, demostrando que la mayor parte de la variación genética (90,49% para COI y 94,39% para 16S-tRNA) se debía a diferencias entre poblaciones. El valor de  $\Phi_{ST}$  fue alto (0,90 para COI y 0,94 para 16S-tRNA), indicando estructuración genética significativa de las poblaciones. Todas las comparaciones por pares de  $\Phi_{ST}$  entre poblaciones fueron significativamente altas, con un rango entre 0,376 y 0,999 para COI y desde 0,329 a 1 para 16S-tRNA, lo que indicó una ausencia de flujo génico entre las poblaciones.

El test de Mantel para el gen más variable, COI, mostró una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas entre las poblaciones ( $r=0,372$ ,  $P=0,0028$ ,  $r^2=0,138$ ).



Localidad	%Arena gruesa	%Arena fina	%Arena total	%Limo grueso	%Limo fino	%Limo total	%Arcilla	Clasificación textural	%C	%N	C/N	pH	Longitud corporal (cm)	N. longitud corporal*
ANC	11,69	17,48	29,16	14,58	36,49	51,08	19,76	Arcillosa	1,78	0,391	4,55	7,90	15,45 (0,79)	6
BOA	59,67	11,93	71,60	2,32	7,61	9,93	18,47	Franco-arenosa	1,18	0,237	4,98	6,42	14,37 (0,50)	15
CAB	65,46	9,28	74,75	4,30	11,62	15,92	9,34	Franco-arenosa	2,15	0,514	4,18	5,68	9,6 (1,37)	2
UCE	22,94	16,53	39,47	26,20	20,14	46,34	14,19	Franca	2,30	0,476	4,83	5,57	12,48 (0,59)	11
FRE	45,34	18,24	63,58	12,41	12,28	24,69	11,74	Franco-arenosa	0,86	0,179	4,79	7,45	12	1
LOZ	50,37	20,21	70,58	10,23	10,76	21,00	8,43	Franco-arenosa	2,00	0,424	4,72	5,49	7,95 (0,54)	13
MOL	52,47	19,91	72,38	2,92	9,61	12,53	15,10	Franco-arenosa	0,96	0,160	5,92	6,40	14,72 (0,87)	5
NAV	51,76	18,22	69,97	10,10	10,50	20,60	9,42	Franco-arenosa	1,88	0,452	4,16	5,35	11,84 (0,61)	10
JAR	36,01	11,48	47,49	12,36	13,69	26,06	26,45	Franco-arcillo-arenosa	1,82	0,343	5,31	7,00	14,54 (0,87)	5
PAR	65,51	8,65	74,16	3,16	7,49	10,65	15,19	Franco-arenosa	1,50	0,263	5,69	6,19	20,83 (0,97)	4
RED	38,15	21,36	59,51	8,63	19,83	28,46	12,03	Franco-arenosa	1,77	0,399	4,45	7,62	12,06 (0,56)	12
SEV	66,19	8,22	74,41	2,93	6,58	9,52	16,08	Franco-arenosa	1,28	0,199	6,46	5,93	12,98 (0,79)	6
SIG	44,99	10,90	55,89	10,74	18,13	28,88	15,23	Franco-arenosa	2,14	0,606	3,54	5,05	22,7 (0,73)	7
SOT	45,11	25,74	70,84	6,50	13,97	20,46	8,69	Franco-arenosa	1,87	0,326	5,74	5,43	15,36 (0,65)	9
TRE	56,29	13,16	69,45	6,08	10,97	17,05	13,50	Franco-arenosa	1,86	0,410	4,55	6,24	14,68 (0,69)	8
VEN	40,69	16,85	57,54	7,95	18,07	26,03	16,44	Franco-arenosa	2,08	0,543	3,83	7,41	14,5	1

**Tabla V.4.** Propiedades del suelo de las localidades muestreadas para *Hormogaster elisae* en el centro de la Península Ibérica. Véase en la Tabla V.1 el nombre completo de las localidades. C: carbono; N: nitrógeno. La desviación típica se muestra entre paréntesis. \*Número de individuos en los que la longitud fue medida (los demás estaban mutilados).

Localidad	N. haplotipos		Diversidad haplotípica ( <i>H</i> )		Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )		Posiciones polimórficas ( <i>S</i> )		Ts		Tv		Divergencia genética	
													media (K2P)	
	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S	COI	16S
ANC	6	1	0,92 (0,07)	0	0,003 (0,002)	0	5	0	4	0	1	0	0,27	0
BOA	4	3	0,56 (0,15)	0,73 (0,16)	0,001 (0,001)	0,001 (0,001)	3	2	3	2	0	0	0,10	0,11
CAB	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
UCE	6	3	0,85 (0,07)	0,73 (0,16)	0,010 (0,006)	0,005 (0,003)	17	8	14	7	3	1	0,99	0,48
FRE	2	2	1,00 (0,50)	1	0,037 (0,037)	0,011 (0,012)	23	9	21	7	2	2	3,67	1,11
LOZ	7	4	0,79 (0,07)	0,71 (0,18)	0,016 (0,008)	0,006 (0,004)	24	9	20	6	4	3	1,60	0,56
MOL	7	5	0,91 (0,06)	0,82 (0,08)	0,010 (0,006)	0,003 (0,002)	21	7	17	4	4	3	1,03	0,30
NAV	6	2	0,68 (0,15)	0,33 (0,22)	0,002 (0,002)	0,0004 (0,0005)	7	3	5	1	2	0	0,22	0,12
JAR	6	5	0,82 (0,08)	0,93 (0,12)	0,014 (0,008)	0,010 (0,006)	20	16	17	16	3	0	1,45	1,01
PAR	5	1	0,76 (0,09)	0	0,002 (0,002)	0	5	0	5	0	0	0	0,25	0
RED	9	5	0,80 (0,06)	0,93 (0,12)	0,039 (0,020)	0,012 (0,007)	58	23	52	16	7	6	3,90	1,17
SEV	3	2	0,67 (0,09)	0,33 (0,22)	0,002 (0,001)	0,0004 (0,0005)	3	1	2	0	1	1	0,17	0,04
SIG	7	6	0,82 (0,12)	1,00 (0,10)	0,009 (0,005)	0,003 (0,002)	15	7	15	7	0	0	0,92	0,34
SOT	3	4	0,68 (0,09)	0,87 (0,13)	0,003 (0,002)	0,005 (0,003)	4	9	4	5	0	3	0,32	0,57
TRE	5	4	0,83 (0,07)	0,87 (0,13)	0,048 (0,025)	0,013 (0,008)	63	20	51	16	13	6	4,77	1,28
VEN	3	3	0,67 (0,09)	0,73 (0,16)	0,021 (0,011)	0,007 (0,004)	24	10	20	7	4	2	2,08	0,73

**Tabla V.5.** Medidas de variabilidad intrapoblacional de los hormogástridos recogidos en el área central de la Península Ibérica basados en los fragmentos de los genes COI y 16S-tRNA. Los valores entre paréntesis indican la varianza de las estimas. La divergencia genética con la corrección del modelo de Kimura 2-parámetros (K2P) se expresa como porcentaje de cambios. Véase en la Tabla V.1 el nombre completo de las localidades. N. haplotipos: número de haplotipos; Ts: número de transiciones; Tv: número de transversiones.

	ANC	BOA	CAB	UCE	FRE	LOZ	MOL	NAV	JAR	PAR	RED	SEV	SIG	SOT	TRE	VEN	<i>H.r</i>	<i>H.p</i>	<i>X.o</i>
<b>ANC</b>	x	12,55	9,84	9,60	8,92	10,37	9,18	10,68	8,76	12,79	8,76	12,53	9,90	9,84	8,97	8,84	12,19	13,15	12,76
<b>BOA</b>	17,81	x	13,42	12,23	13,19	13,36	12,43	13,70	12,52	7,27	12,42	3,21	13,74	13,66	12,35	12,23	17,39	17,12	15,75
<b>CAB</b>	16,29	18,99	x	7,45	5,97	1,34	5,01	2,01	4,93	12,79	4,68	13,26	8,30	8,12	4,46	4,66	17,91	17,95	16,18
<b>UCE</b>	18,74	22,06	17,95	x	6,85	7,02	7,01	7,32	6,61	11,69	5,93	11,59	7,67	7,40	6,35	6,38	19,11	18,53	15,55
<b>FRE</b>	16,37	20,15	15,33	16,41	x	6,14	5,62	5,92	4,99	13,35	4,78	13,00	8,93	8,67	4,77	5,09	18,76	17,90	15,74
<b>LOZ</b>	17,22	18,88	5,00	17,67	14,95	x	4,97	2,10	4,62	12,72	4,37	13,23	8,23	8,05	4,53	4,50	17,83	18,09	16,18
<b>MOL</b>	16,93	19,99	12,38	16,39	12,65	13,11	x	4,96	1,98	12,06	1,48	12,54	7,66	7,56	1,08	1,68	18,25	18,13	15,62
<b>NAV</b>	16,96	19,30	4,00	17,15	14,18	4,73	11,19	x	4,89	13,33	4,52	13,67	8,07	7,85	4,51	4,86	18,21	18,24	16,61
<b>JAR</b>	15,23	18,96	10,81	14,35	12,15	11,53	6,08	11,46	x	11,84	0,98	12,62	7,62	7,46	1,15	0,44	18,31	17,84	15,56
<b>PAR</b>	18,31	10,99	20,27	19,94	19,86	19,57	18,97	19,31	19,89	x	11,80	7,13	12,95	12,63	12,05	11,73	18,65	18,03	18,14
<b>RED</b>	14,91	17,52	9,64	12,75	11,57	10,83	5,84	10,15	3,50	17,72	x	12,72	7,31	7,20	0,77	0,70	18,22	17,85	15,45
<b>SEV</b>	17,06	6,55	20,07	21,04	17,95	18,46	20,19	19,36	17,83	11,41	16,58	x	13,67	13,47	12,76	12,45	19,05	18,13	16,20
<b>SIG</b>	15,22	19,71	17,70	19,19	15,51	17,28	15,19	17,82	14,48	17,97	12,85	18,30	x	0,55	7,45	7,59	19,01	17,92	15,09
<b>SOT</b>	15,73	18,95	18,45	19,64	15,37	17,59	15,88	17,92	15,48	18,73	14,05	18,57	2,03	x	7,21	7,38	18,93	17,98	15,66
<b>TRE</b>	14,89	16,72	10,79	14,15	12,04	10,86	3,45	10,09	5,69	16,05	4,37	17,28	12,71	13,31	x	0,93	18,03	17,34	15,06
<b>VEN</b>	15,34	18,46	10,49	13,52	11,94	11,34	5,69	10,60	1,45	18,88	2,05	17,59	14,54	15,19	4,55	x	18,35	17,77	15,47
<i>H.riojana</i>	19,73	18,64	20,07	23,21	21,41	22,04	20,87	21,07	20,23	17,45	19,60	18,82	20,94	21,34	18,36	20,0	x	6,62	15,04
<i>H.pretiosa</i>	21,87	22,51	21,26	24,53	21,79	21,59	22,11	20,14	21,69	20,97	20,92	23,18	23,25	23,34	19,95	21,42	15,83	x	12,67
<i>X.omodeoi</i>	20,85	21,39	21,54	22,84	21,20	21,35	21,27	20,86	20,12	19,26	18,43	21,21	22,15	21,14	18,58	19,65	21,03	19,98	x

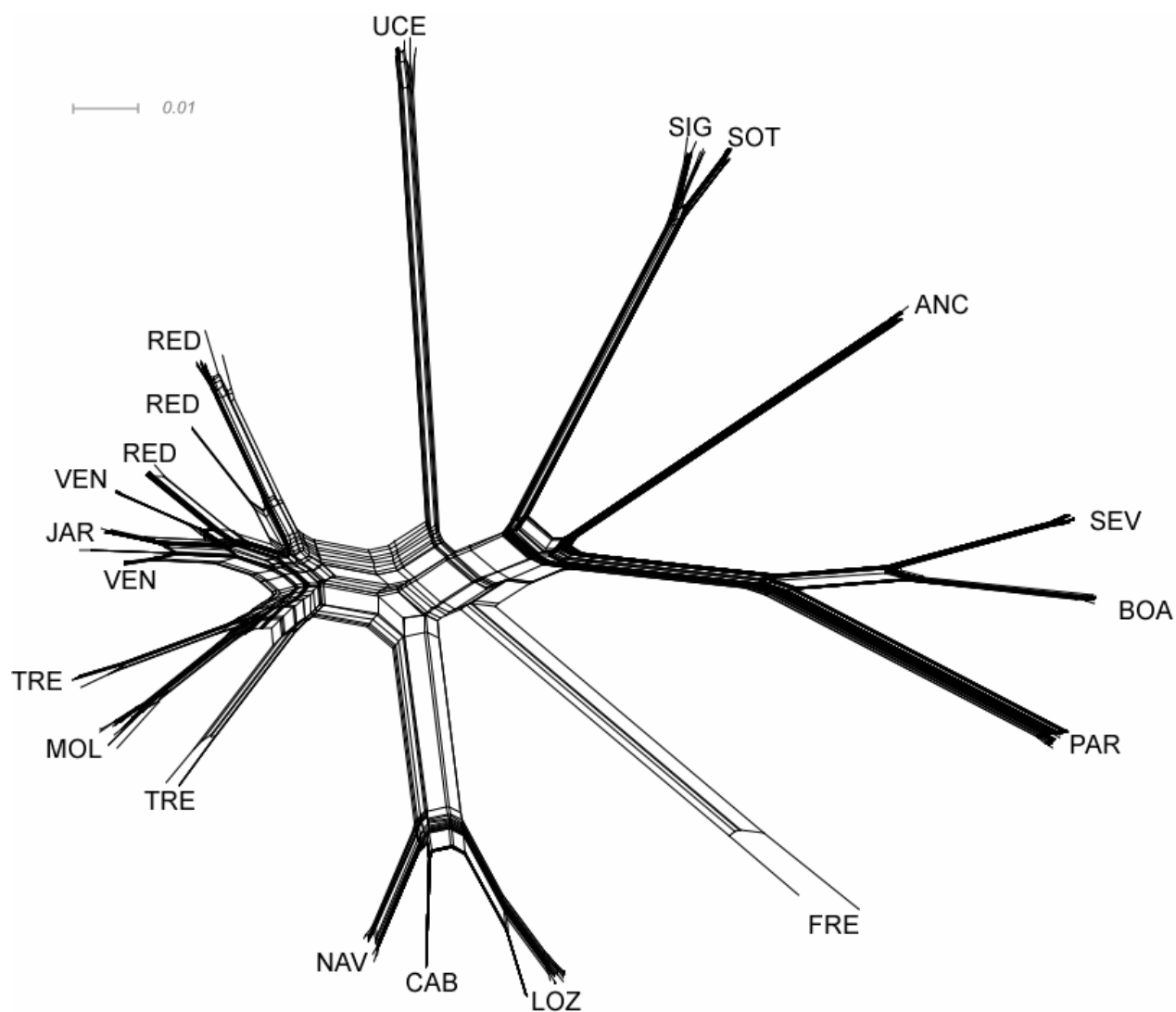
**Tabla V.6.** Divergencia genética media (Kimura 2-parámetros, en porcentaje de cambios) entre pares de poblaciones de hormogástridos en el área central de la Península Ibérica, obtenidas a partir de los datos de COI (por debajo de la diagonal) y 16S-tRNA (por encima de la diagonal). Se incluyen las especies utilizadas como referencia. Véase el nombre completo de las localidades en la Tabla V.1. H.r: *H. riojana*; H.p: *H. pretiosa*; X.o: *X. omodeoi*.

### V.3.5. Redes de haplotipos

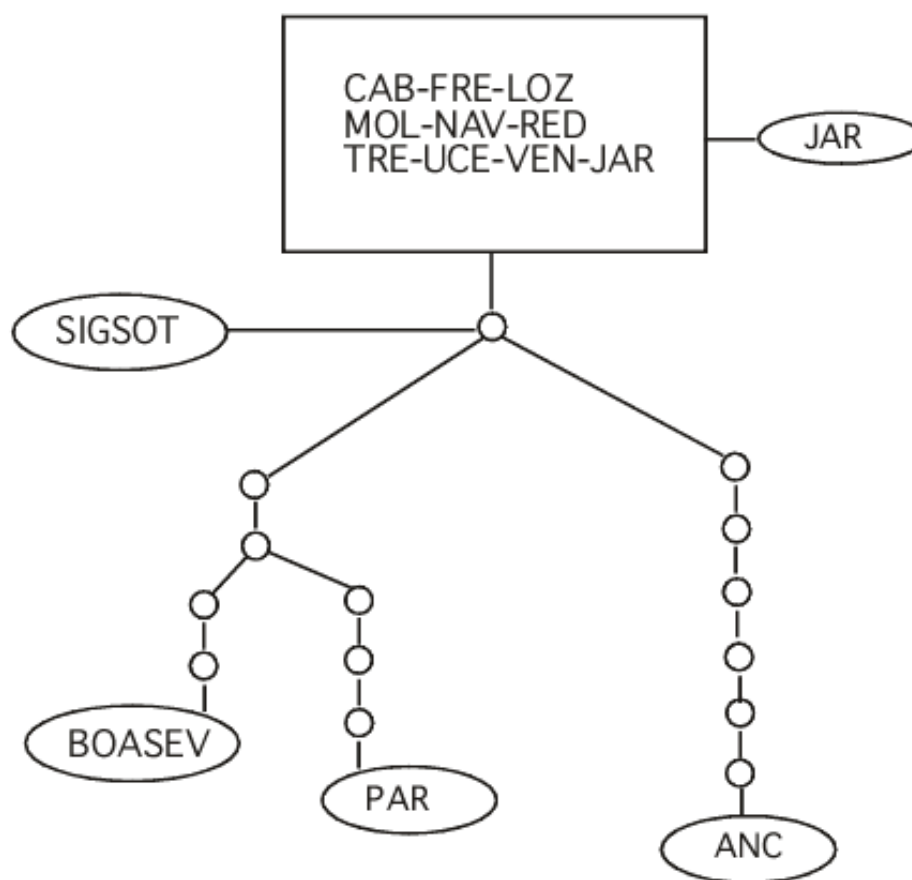
La red de haplotipos obtenida con TCS para el gen COI y un nivel de parsimonia de 95% mostró a cada población como una red diferente, es decir, desconectada del resto de las poblaciones, con la excepción de Paracuellos del Jarama y Venturada, en las que algunos de sus haplotipos se agrupaban. Incluso dentro de algunas poblaciones los haplotipos se representaban en redes diferentes. Esto proporciona una idea del alto grado de diferenciación y diversidad encontrado. Debido al alto número de saltos mutacionales y al elevado grado de polimorfismo de las terceras posiciones del codon, se construyó una red excluyendo estas posiciones. El resultado mostró cinco redes diferenciadas (no se muestra) que se corresponden con las siguientes poblaciones: (I) Anchuelo; (II) Boadilla del Monte y Sevilla la Nueva; (III) Pardo; (IV) Siguero y Soto del Real; y (V) el resto de poblaciones. La red generada por SPLITSTREE4 se muestra en la Figura V.2. Se pudieron observar nueve grandes linajes, que coinciden con los obtenidos en los árboles filogenéticos (véase próxima sección).

Al reconstruir la red con 16S-tRNA, considerando los gaps como “missing data” y un nivel de parsimonia del 95%, se obtuvieron diez redes diferentes (no se muestran) y sólo se pudieron diferenciar los siguientes grupos: Cabrera con Lozoyuela, Siguero con Soto del Real, Paracuellos del Jarama con Molar, Redueña, Tres Cantos y Venturada. Los haplotipos de las poblaciones restantes estaban desconectados.

Finalmente el fragmento del gen más conservado, 28S, mostró una red en la que todos los haplotipos se presentaban conectados (Figura V.3) y en la que también se podían distinguir cinco grupos: (I) Anchuelo; (II) Boadilla del Monte y Sevilla la Nueva; (III) Pardo; (IV) Siguero y Soto del Real; y (V) las poblaciones restantes. De acuerdo con el programa TCS, el grupo (V) contendría el haplotipo ancestral, que está representado en el mayor número de poblaciones. Sin embargo, parece que hay todavía un haplotipo sin muestrear que podría haber dado lugar a los demás, debido a su posición central en la red.



**Figura V.2.** Representación de la red elaborada por el programa SPLITSTREE4 a partir de los datos del gen COI. La abreviatura de cada localidad (véase Tabla V.1) se muestra en la rama o ramas en las que están localizados sus haplotipos.



**Figura V.3.** Representación de la red elaborada por el programa TCS para el fragmento analizado del gen 28S. Cada haplotipo se nombra con la abreviatura de la localidad o localidades donde se encontró (véase Tabla V.1). El tamaño de los óvalos y el rectángulo (haplotipo ancestral de acuerdo con el programa TCS) está relacionado con la frecuencia haplotípica. Los círculos vacíos representan haplotipos intermedios (no muestreados). Cada rama representa un cambio mutacional y su longitud carece de significado.

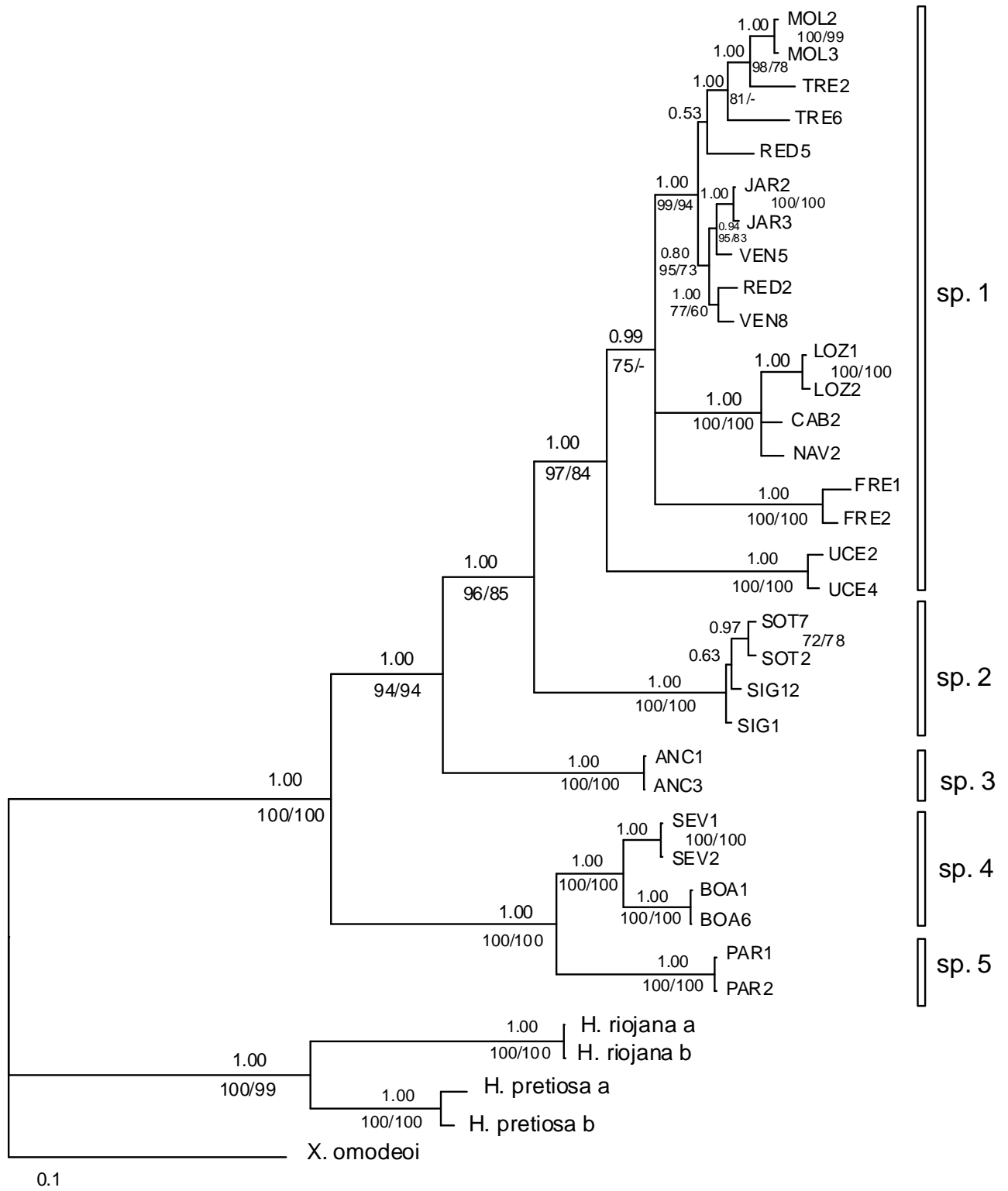
### V.3.6. Relaciones filogenéticas

El tamaño de los fragmentos utilizados después de GBLOCKS fue 648 pares de bases para COI, 770 pares de bases para 16S-tRNA, 739 pares de bases para 28S y 2152 pares de bases para la secuencia concatenada. Todos los árboles (BI, ML, MP) generados con las diferentes particiones y la secuencia concatenada produjeron topologías congruentes. Además, el test ILD no encontró incongruencia significativa entre las particiones ( $P > 0,05$ ). Las pruebas de máxima verosimilitud llevadas a cabo con JMODELTEST indicaron que los mejores modelos para los datos eran GTR+I+G

para las particiones de 16S-tRNA y 28S, y Trn+I+G para el fragmento de COI. Para este último, también se utilizó el modelo GTR+I+G para los análisis porque fue el segundo mejor modelo seleccionado por el AIC.

El árbol inferido mediante BI a partir de la secuencia combinada se muestra en la Figura V.4. El árbol de ML para estos datos tenía un valor de “log likelihood” de -10,200.40212 y el análisis MP arrojó cinco árboles más parsimoniosos (L=1510, CI=0.49, RI=78). Sus valores de soporte (Bootstrap) se muestran también en la Figura V.4. Las relaciones filogenéticas principales fueron exactas en todos los árboles y estaban bien soportadas por valores altos de Bootstrap y probabilidad posterior, mientras que algunas de las relaciones a niveles inferiores se mostraron diferentes según los análisis.

De acuerdo con todos los análisis filogenéticos, está claro que la morfoespecie *H. elisae* del centro de la Península Ibérica constituye un grupo monofilético que se separa claramente de las otras especies de *Hormogaster* incluidas en el análisis, *H. riojana* y *H. pretiosa*. Estas especies aparecen agrupadas, a pesar de estar separadas por una gran distancia geográfica (véase Figura V.1). En segundo lugar, se representan dos grandes grupos y las poblaciones de Boadilla del Monte, Sevilla la Nueva y Pardo se separan claramente de las demás poblaciones. Se identificaron nueve unidades evolutivas en todos los árboles: (I) Molar, Tres Cantos, Redueña, Paracuellos del Jarama y Venturada; (II) Lozoyuela, Cabrera y Navas de Buítrago; (III) Fresno del Torote; (IV) Cubillo de Uceda; (V) Soto del Real y Sigüero; (VI) Anchuelo; (VII) Sevilla la Nueva; (VIII) Boadilla del Monte; y (IX) Pardo, las mayoría de ellas con unos valores de probabilidad posterior de 1.00 y valores de Bootstrap de 100%. Las posiciones de (III) y (IV) difieren entre análisis, con estas unidades a veces representadas como un grupo (BI con COI); con (III) a veces más relacionada con (I) y (II) (16S y BI y ML con la secuencia concatenada); con (IV) a veces más relacionado con (I) y (II) (ML y MP para COI) o apareciendo como una politomía (MP para la secuencia concatenada). A pesar de las variaciones, estas unidades siempre aparecen agrupadas con (I) y (II), representando todas ellas un grupo monofilético.



**Figura V.4.** Hipótesis filogenética reconstruida por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los tres fragmentos concatenados en la morfoespecie *Hormogaster elisae*. Los valores de probabilidad posterior se muestran en la parte superior de las ramas cuando son mayores de 0,5. Los valores de Bootstrap (1.000 pseudoréplicas) de asociaciones coincidentes dadas por ML y MP se muestran en la parte inferior de las ramas cuando son superiores al 50% (ML/MP). Se nombra a cada haplotipo con la abreviatura de su localidad (véase Tabla V.1) seguida por su número. Se indican las especies crípticas propuestas (sp. n, véase la discusión).



### V.3.7. Diferenciación entre especies propuestas

Como resultado del estudio previo realizado en el capítulo IV de esta memoria y la presente investigación, se propone la existencia de al menos cinco especies crípticas dentro de la morfoespecie *H. elisae* (véase discusión), única especie descrita de hormogástrido encontrada hasta ahora en el centro de la Península Ibérica. Teniendo en cuenta esto, se calcularon los valores de divergencia de los genes mitocondriales para estas especies, que se muestran en la Tabla V.7.

Los valores de divergencia fueron altos y estaban en un rango desde 9,49% hasta 18,31% para COI y desde 5,84% hasta 13,05% para 16S-tRNA. La especie 1 todavía mostraba una divergencia intraespecífica alta de 10,43% para COI y 4,47% para 16S-tRNA. Es destacable que los valores de divergencia entre las especies propuestas y *X. omodeoi* fueron similares o menores (en el caso de la partición de 16S-tRNA) que los valores entre ellas y otras especies del género *Hormogaster*.

Se realizó también un AMOVA (Tabla V.8), que mostró que la mayoría de la variación genética (más del 60%) se debía a diferencias entre especies. Los valores de  $\Phi_{ST}$  fueron altos (mayores de 0,62), indicando una estructuración genética significativa.

	Especie 1	Especie 2	Especie 3	Especie 4	Especie 5	<i>H.riojana</i>	<i>H.pretiosa</i>	<i>X.omodeoi</i>
Especie 1	10,43/4,27	5,84	8,07	10,29	10,69	16,42	16,15	13,90
Especie 2	11,17	1,66/0,72	10,44	12,90	12,89	18,82	17,81	15,23
Especie 3	12,00	14,95	0,27/0	11,74	13,05	17,06	17,08	15,22
Especie 4	12,74	16,64	15,72	3,55/1,67	6,35	17,43	16,84	15,18
Especie 5	14,68	17,84	18,31	9,49	0,25/0	18,65	18,03	18,14
<i>H.riojana</i>	16,42	20,62	19,73	17,02	17,45	x	6,62	15,04
<i>H.pretiosa</i>	17,25	22,77	21,87	21,14	20,97	15,83	x	12,67
<i>X.omodeoi</i>	16,17	21,09	20,85	19,59	19,26	21,03	19,98	x

**Tabla V.7.** Divergencia genética media (Kimura 2-parámetros, en porcentaje de cambios) entre pares de especies crípticas propuestas en el centro de la Península Ibérica obtenidas a partir de los datos de COI (por debajo de la diagonal) y 16S-tRNA (por encima de la diagonal). En la diagonal se muestran los valores de variación intraespecífica (COI/16S-tRNA). Se incluyen las especies externas como referencia. Véase Figura V.4 para la asignación de especies.

	Fuente de variación	gl	Porcentaje de variación	$\Phi_{ST}$
<b>COI</b>	Entre especies	4	62,34	0,62341 (P < 0,0001)
	Dentro de especies	197	37,66	
<b>16S</b>	Entre especies	4	72,58	0,72583 (P < 0,0001)
	Dentro de especies	89	27,42	

**Tabla V.8.** Resultados del análisis molecular de la varianza (AMOVA) para las especies propuestas en las poblaciones de hormogástridos analizadas, basado en los datos de los fragmentos de los genes COI y 16S-tRNA. gl: grados de libertad.

## V.4. Discusión

### V.4.1. Un único evento de colonización

Los resultados de este capítulo sugieren que los hormogástridos encontrados en el centro de la Península Ibérica, identificados como la morfoespecie *H. elisae*, pertenecen a un único linaje evolutivo. El árbol filogenético muestra que los haplotipos de las poblaciones estudiadas constituyen un grupo monofilético que se separa claramente de las otras especies de *Hormogaster* incluidas en el análisis. Estas otras especies aparecen agupadas, a pesar de estar separadas por una gran distancia geográfica. Dichas relaciones filogenéticas están bien soportadas y corroboradas por datos mitocondriales y nucleares. Así, se podría inferir que en el centro de la Península Ibérica se produjo un único evento de colonización, provocando la diferenciación de este grupo de hormogástridos del resto de las especies pertenecientes al mismo género y también su homogeneidad morfológica.

Este linaje evolutivo es el único del género *Hormogaster* cuya morfología incluye espermatecas tubulares y tiflosol con cinco láminas longitudinales. El resto de las especies descritas del género muestran un patrón morfológico muy homogéneo, representado por espermatecas globulares, que son de menor tamaño en relación con el tamaño corporal de las lombrices, y un número mayor de láminas longitudinales en el tiflosol (Qiu y Bouché 1998). Presumiblemente, este evento de colonización se originó a partir de individuos que provenían del norte o del este de la Península Ibérica, ya que

en esas zonas se encuentra la mayor biodiversidad descrita dentro de esta Familia de lombrices de tierra. Además, las poblaciones estudiadas en este capítulo se encuentran en el límite occidental de la distribución de los Hormogastridae (Cobolli Sbordoni *et al.* 1992), indicando que la colonización de esta área podría haber sido un evento posterior. La red de haplotipos construida para el 28S muestra que probablemente no hemos encontrado todavía la línea de colonización principal, ya que el haplotipo central, a partir del cual surgen un mayor número de ramificaciones, parece que aún no ha sido muestreado. Es posible que esta línea de colonización viniera de un área más oriental ya que entre el centro y nordeste de la Península Ibérica hay un territorio totalmente desconocido en términos de fauna de lombrices de tierra. Los análisis demográficos realizados en el capítulo IV, sugerían que la colonización podría haber ocurrido a partir de dos grupos migrantes separados desde Sigüero (la población situada más al norte de las estudiadas), uno de los cuales colonizaría las zonas de valle (en ese estudio: Anchuelo, Boadilla del Monte, Sevilla la Nueva y El Pardo) y un segundo grupo que se dispersó hacia las zonas de montaña (el resto). Los resultados de dicho capítulo son compatibles con la red de 28S, aunque en ese caso faltaría encontrar el haplotipo no muestreado, que sería aquel a partir del cual surgen esos dos linajes procedentes de Sigüero y Soto del Real. Sin embargo, el programa TCS muestra como ancestral (es decir, el que está representado como un rectángulo) el haplotipo de las poblaciones de montaña, pero puede ser debido a su alta frecuencia. Es probable que esta área constituya un ambiente con mejores condiciones para el desarrollo de estas lombrices de tierra, explicando así su mayor abundancia en esta zona, como se discutirá más adelante.

Existe también la posibilidad de que los antecesores de la línea evolutiva del centro de la Península Ibérica hayan desaparecido y que *H. elisae* sea una forma relict, conservada en algún tipo de refugio durante un tiempo, desde el cual se expandió hasta su distribución actual y sin relación directa en este momento con el resto de *Hormogaster* ibéricos.

En cualquier caso, es necesario un estudio que incluya la mayoría de las especies de la Familia, así como un muestreo de áreas inexploradas entre las zonas donde se encuentra la morfoespecie *H. elisae* y el territorio de los demás miembros de Hormogastridae para poder contextualizar la red obtenida en el presente estudio en la historia biogeográfica de estas lombrices.

#### V.4.2. Diversificación de nivel específico

A partir de la línea colonizadora o de alguna población mantenida en un refugio se produjo una expansión para ocupar diferentes zonas del centro de la Península Ibérica. Como se mencionó previamente, el área montañosa representa una mayor diversidad y sus poblaciones fueron más fáciles de localizar, lo que podría ser la explicación de la mayor abundancia presente en esta zona. Ésta es probablemente un área más favorable para el desarrollo de los hormogástridos, lo que podría explicar que se hayan establecido en ella y que muestren generalmente valores más altos de diversidad genética. Por otra parte, las condiciones ambientales en el área meridional podrían ser menos óptimas, lo cual está de acuerdo con el mayor nivel de dificultad en encontrar poblaciones y sus menores valores de diversidad. Estas poblaciones parecen representar la vanguardia de este linaje evolutivo, razón por la cual la especiación y diversificación está en aumento en esta zona meridional. Estas hipótesis son consistentes con el patrón encontrado en el capítulo IV, en el que se mostraban procesos de expansión en las poblaciones del sur y estabilidad demográfica en las poblaciones de montaña.

La alta diversificación ha provocado divergencias genéticas muy altas y linajes independientes que, sin embargo, no reflejan adaptaciones morfológicas diferentes. Esta diferenciación ya está reflejada a nivel poblacional, como muestran los resultados de la AMOVA, los altos valores de  $\Phi_{ST}$ , el hecho de que los haplotipos sean exclusivos de localidad y las redes inconexas representadas por el programa TCS. Todo ello, indica un alto grado de aislamiento y una ausencia de flujo génico entre las poblaciones estudiadas.

Considerando estos datos y los del capítulo IV, y siguiendo a Wiens y Penkrot (2002) se propone que esta diversificación ha causado la formación de cinco especies crípticas dentro del complejo de *H. elisae*. La correspondencia de estas especies con las poblaciones muestreadas se puede observar en la Figura V.4. Para justificar la subdivisión que sugerimos, es interesante tener en cuenta los valores de divergencia que existen entre las especies propuestas, que son altos y similares a aquellos que hay entre especies diferentes. Los valores encontrados están entre 9,5% y 18,3% para el gen COI y entre 5,8% y 13% para el 16S. Estos altos valores de divergencia se encuentran en el

rango de valores medios de Kimura 2-parámetros encontrados para el COI por Hebert *et al.* (2003b) de 11,3% (entre especies congénicas de varios grupos animales) y 15,7% (entre especies de anélidos). Estos valores son también comparables a los valores encontrados entre especies en este estudio. Por ejemplo, los valores de divergencia entre *H. riojana* y *H. pretiosa* son de 15,8% para COI y 6,62% para 16S.

Se han encontrado valores similares en otros estudios de anélidos clitelados y la mayor parte de la información recae sobre el gen COI. Bely y Wray (2004) encontraron distancias de COI entre 5%-17% entre especies del mismo género de oligoquetos naídidos, Trontelj y Utevsky (2005) observaron distancias de COI de aproximadamente 9% entre cuatro especies de *Hirudo* y Gustafsson *et al.* (2009) propusieron especies crípticas dentro de *Lumbriculus variegatus* al encontrar dos linajes separados por una divergencia de 18% en el gen COI.

Existen también diversos estudios de lombrices de tierra, como el realizado por Chang y Chen (2005) que encontraron divergencias inter-específicas en el COI de 10,2%-25,5% dentro del género *Metaphire*. Chang *et al.* (2009) intentaron establecer valores de divergencia para distinguir especies con el gen COI y encontraron divergencias (distancias sin corregir) entre 4,8% y 27,3%. Huang *et al.* (2007) propuso un valor medio de 15% de divergencia de COI para especies bien distinguibles y alrededor de 7% para especies hermanas o subespecies. Chang *et al.* (2008) encontraron divergencias inter-específicas en el COI entre 12,9% y 27,7%. King *et al.* (2008) propusieron especies crípticas diferentes en *Allolobophora chlorotica* cuando encontraron divergencias en el COI de 12,8%-19,2% y en el rango de 2%-5,6% para el fragmento génico 16S-tRNA. Finalmente, Cameron *et al.* (2008), estudiando *Dendrobaena octaedra*, y Pérez-Losada *et al.* (2009) en los Lumbricidae encontraron también linajes altamente divergentes. Así, nuestros valores de divergencia entre especies propuestas parecen estar soportados por otros estudios en grupos similares. También hay que señalar que el AMOVA mostró estructuración genética significativa al agrupar las poblaciones en estas especies.

Además de los altos valores de divergencia de los genes mitocondriales, la red construida con el gen 28S exhibió precisamente la distinción de las cinco especies propuestas. Este gen ha sido utilizado para dilucidar relaciones filogenéticas a niveles

taxonómicos superiores (Pérez-Losada *et al.* 2005, 2009) y por lo tanto, el hecho de que diferencie los cinco grupos podría ser una confirmación de su valor específico.

Asímismo, los cinco grupos se muestran como redes inconexas al analizar el gen COI, cuando se excluyen las terceras posiciones, y se distinguen como linajes evolutivos independientes en todos los árboles filogenéticos. Sin embargo, no se debe olvidar que tanto los árboles filogenéticos como la red construida por SPLITSTREE4 para el COI muestran la existencia de nueve linajes evolutivos. Boadilla del Monte y Sevilla la Nueva (propuestas como especie 4) resultaron ser linajes evolutivos diferentes, pero los valores de divergencia entre ellas eran bajos (6,55% para COI y 3,21% para 16S) y representaban un mismo haplotipo para el gen 28S. Los cuatro linajes “extra” restantes además de las especies propuestas, se incluyeron en la especie 1. Esta especie críptica mostró una divergencia intra-específica alta (10,43% para COI y 4,27% para 16S) que debería ser estudiada en un futuro. De hecho, Cubillo de Uceda y Fresno del Torote podrían ser otro ejemplo de especiación críptica y su independencia como linajes evolutivos diferentes se puede apreciar claramente en la red generada por el programa SPLITSTREE4 y en los árboles filogenéticos, pero su posición es incierta ya que se mostraron diferencias entre los análisis filogenéticos aplicados. Además, solo se pudieron conseguir dos individuos de la población de Fresno del Torote, lo que no es un tamaño de muestra suficiente para respaldar una conclusión clara. Finalmente, se incluyeron todas estas poblaciones divergentes dentro de la especie 1 para ser prudentes, ya que compartían el mismo haplotipo para el gen 28S. En la Figura V. 3 se muestra que hay una población (Paracuellos del Jarama) que contiene dos haplotipos del gen 28S diferentes. Esta población se encuentra en la frontera del área muestreada para la especie 1 y podría indicar la diferenciación potencial de esta población en un futuro. Somos conscientes de que es necesario un estudio más detallado centrando la atención en la especie 1, para dilucidar el nivel de biodiversidad real que ésta contiene.

#### **V.4.3. Especiación críptica**

La constancia morfológica encontrada en los individuos estudiados de *H. elisae* no permite la distinción de las cinco especies propuestas sin ayuda de las técnicas moleculares. Estas técnicas resultan particularmente importantes en estudios de

invertebrados que viven en ambientes crípticos como es el caso del suelo, y podrían ser el único medio de revelar el nivel real de biodiversidad (Proudlove y Wood 2003).

Estos patrones discordantes de evolución morfológica y molecular (estasis morfológica) pueden ser comunes en el ambiente edáfico, donde las señales químicas podrían jugar un papel más importante que la morfología en la selección sexual (Lee y Frost 2002).

Las condiciones extremas en el interior del medio edáfico podrían también provocar restricciones morfológicas que serían responsables de una convergencia morfológica a lo largo de extensos periodos (Jones *et al.* 1992, Caccione y Sbordoni 2001, Wiens *et al.* 2003). La morfoespecie *H. elisae* vive en suelos arenosos, pobres en materia orgánica y sometidos a una fuerte erosión y aridez estival (Valle *et al.* 1997, Hernández 2005). Se encontraron porcentajes bajos de materia orgánica en las localidades estudiadas en comparación con aquellos observados por otros autores en estudios de lombrices de tierra en otras zonas de la Península Ibérica (Mariño *et al.* 1985). Esto, junto con las condiciones climáticas extremas (inviernos fríos y veranos calurosos y secos) del centro de la Península Ibérica, hace que los lugares estudiados no sean adecuados para la mayor parte de especies de lombrices de tierra. Este hecho favorece la predominancia de especies endogeas (Hernández *et al.* 2007), como *H. elisae*, que pueden protegerse mejor de las agresiones biológicas y climáticas en los niveles más profundos del suelo y son capaces de alimentarse de recursos más pobres que las epigeas (Lavelle 1981). De hecho, se ha visto que *H. elisae* puede entrar en paradiapausa (Díaz Cosín *et al.* 2006) en caso de que las condiciones sean desfavorables.

El desacoplamiento entre las características moleculares y morfológicas encontrado en el presente estudio, se ha observado también en otros taxones que se encuentran en ambientes aislados, como los anfípodos (Hogg *et al.* 2006, Lefébure *et al.* 2006, Finston *et al.* 2007), invertebrados del suelo (Tully *et al.* 2006) y otras lombrices de tierra (King *et al.* 2008). Típicamente, las especies crípticas dentro de un taxón morfológico tienen distribuciones geográficas distintas, no solapantes (Wilke y Pfenninger 2002, Challis *et al.* 2007), como es el caso de las cinco especies propuestas, quizás porque el aislamiento alopátrico limita el flujo génico entre áreas de hábitat

adecuado (Hogg *et al.* 2006). La selección estabilizadora estaría impuesta por el ambiente especializado y minimizaría o eliminaría el cambio morfológico que puede ocurrir durante la especiación (Bickford *et al.* 2007). Chang *et al.* (2008) sugirieron un patrón de especiación alopátrica en lombrices de tierra, mientras que King *et al.* (2008) encontraron linajes altamente divergentes de estos animales incluso en simpatria.

Las diferencias en talla entre poblaciones de los especímenes estudiados es una distinción morfológica que, como se ha demostrado, no puede ser justificada por una diferenciación genética. Estos resultados son contrarios a los que obtuvieron Heethoff *et al.* (2004) que mostraron cómo dos clases de tamaño de la lombriz *Octolasion tyrtaeum* constituían dos linajes bien separados para el gen COII.

En nuestro caso, las diferencias de tamaño podrían atribuirse a variaciones ambientales como disponibilidad de alimento (por ejemplo, contenido en carbono) y otras propiedades del suelo. Sin embargo, no hemos encontrado una correlación para los factores del suelo medidos, así que sería necesario un análisis más exhaustivo de las características ambientales para determinar con certeza la razón de estas diferencias de tamaño. Otra posibilidad, es que éstas estuvieran provocadas por una competencia intra o inter-específica, que ya ha sido propuesta en lombrices de tierra (Garvín *et al.* 2002, Uvarov 2009) y concretamente en *H. elisae* (Ramajo 2010), dependiendo de la densidad de población y la composición de fauna de cada localidad. De hecho, se ha observado en condiciones de laboratorio, que los individuos aislados de *H. elisae* procedentes de El Molar, que se alimentaron *ad libitum* alcanzaron tamaños similares a aquellos presentados por los individuos más grandes de nuestro estudio (observación personal).

#### **V.4.4. ¿Cual es la causa de las altas divergencias?**

Se ha encontrado un patrón de aislamiento por distancia (IBD, Wright 1943) y también se ha observado una correlación entre divergencias genéticas y propiedades del suelo como el porcentaje de arena gruesa y porcentaje de limo total. Esto podría indicar que el escenario presente podría ser debido a una colonización progresiva en el pasado y una alta fragmentación de las poblaciones durante un largo periodo de tiempo. Estas poblaciones han sido modeladas genéticamente, pero no morfológicamente por el ambiente en el que viven. Este es el primer estudio que sugiere que los factores



ambientales tienen una influencia en la evolución genética de las lombrices de tierra. Por el contrario Lentzsch y Golldack (2006) indicaron que la distribución de los genotipos de *Allolobophora caliginosa* no estaba relacionada con las propiedades del suelo. Sin embargo, se conoce bien la relación entre la distribución de las lombrices de tierra y los factores del suelo (Lavelle y Spain 2001, Edwards 2004) y concretamente se ha demostrado que la abundancia de *H. elisae* está correlacionada positivamente con el porcentaje de arenas totales y arenas gruesas, y de forma negativa con arcillas, nitrógeno, carbono y contenidos en limo grueso (Hernández *et al.* 2007).

Las altas divergencias encontradas y la estructuración genética exhibida por el AMOVA podrían explicarse por la escasa capacidad de dispersión de las lombrices. Se ha visto que las lombrices de tierra tienen bajas tasas de migración entre poblaciones, con tasas naturales observadas de sólo 1,4–9 m/año (Ligthart y Peek 1997, Hale *et al.* 2005) y los resultados del capítulo III de esta memoria indican que *H. elisae* no se desplaza demasiado a una escala geográfica pequeña. Este patrón de aislamiento por distancia podría deberse a una dispersión progresiva de las lombrices de tierra por medio de dispersión activa o dispersión pasiva no mediada por el hombre (por ejemplo, por aves, mamíferos, viento o cursos de agua) (Cameron *et al.* 2008), aunque hay evidencia limitada de la última (Meijer 1972, Schwert y Dance 1979, Terhivuo 1988). Esta capacidad de dispersión limitada, junto con la naturaleza endogea de *H. elisae* y el ambiente extremo en el que vive, facilita el gran aislamiento de las poblaciones y la ausencia de flujo génico entre ellas. Además, la Península Ibérica fue uno de los refugios donde las especies de animales y plantas sobrevivieron durante las glaciaciones del Cuaternario (Huntley y Birks 1983, Taberlet *et al.* 1998, Hewitt 2001), lo que podría explicar los altos valores de divergencia genética acumulados en las poblaciones estudiadas del centro de la Península Ibérica.

**VI. Filogenia de la Familia Hormogastridae basada en datos  
moleculares**



## VI. Filogenia de la Familia Hormogastridae basada en datos moleculares

### RESUMEN

La taxonomía clásica de lombrices de tierra se ve limitada por la simplicidad estructural de estos animales y la variabilidad de las características que se utilizan normalmente para diagnosticar especies. En este capítulo se utilizan herramientas moleculares para desvelar la filogenia de los Hormogastridae. Esta Familia incluye cuatro géneros y 22 especies (y ocho subespecies o variedades) de lombrices de tamaño mediano y grande, distribuidas casi exclusivamente en el Mediterráneo occidental, donde tienen un papel ecológico muy importante. Se recogieron 376 individuos, que representaban los cuatro géneros y 20 de las especies descritas, en 46 localidades diferentes de la Península Ibérica, Francia, Córcega y Cerdeña. Los marcadores moleculares utilizados incluyeron las regiones mitocondriales del citocromo c oxidasa subunidad I (COI), el gen ribosómico 16S y los tRNA Leu, Ala, Ser, dos genes ribosómicos nucleares (secuencia completa del 18S y un fragmento del 28S) y dos genes codificantes de proteínas (histona H3 e histona H4). Los valores de diversidad genética de la Familia resultaron muy altos y similares a los que ésta presenta con los lumbrícidos. El género *Hormogaster* es polifilético y también lo es *Hormogaster pretiosa*, lo que implica la necesidad de una revisión taxonómica. *Vignysa* podría ser la forma ancestral de la Familia, aunque las relaciones entre géneros no están claramente definidas, como muestran las incongruencias de los resultados obtenidos entre los distintos análisis. *Hemigastrodrilus* parece estar relacionado con el complejo de *Hormogaster elisae*, y ambos se encuentran en la vertiente Atlántica. *H. elisae* representa un linaje evolutivo con una alta diversidad genética y cinco especies crípticas (capítulo V de esta memoria) que proponemos como un nuevo género dentro de los Hormogastridae. Córcega y Cerdeña parecen haber recibido dos influencias genéticas diferentes. Las especies localizadas en Córcega y en el norte de Cerdeña parecen estar más relacionadas con *Vignysa*, mientras *H. pretiosa*, en el sur de Cerdeña, está más relacionada con algunas especies de *Hormogaster* del nordeste de España, donde hay dos linajes diferentes. Una calibración del reloj molecular del árbol utilizando la separación de la microplaca de Cerdeña (hace 33 millones de años) indicó que la

diversificación de los Hormogastridae parece ser muy antigua, comenzando hace unos 97-75 millones de años.

## ABSTRACT

The classical taxonomy of earthworms is somehow limited due to their anatomical simplicity and the variability of their characteristics often used for diagnosing species. In this study we use molecular tools to unravel the phylogeny of Hormogastridae. This family includes four genera and 22 species (and eight subspecies or varieties) of large to middle-sized earthworms distributed almost exclusively in the western Mediterranean where they play a very important ecological role. We collected 376 individuals representing the four described genera and 20 species in 46 different locations from the Iberian Peninsula, France, Corsica and Sardinia. Molecular markers included mitochondrial regions of the cytochrome *c* oxidase subunit I gene (COI), 16S rRNA gene and tRNA Leu, Ala, and Ser, two nuclear ribosomal genes (complete 18S rRNA and a fragment of 28S rRNA) and two nuclear protein-encoding genes (histone H3 and histone H4). Genetic diversity values within the family are very high and similar to the ones that it presents with lumbricids. The genus *Hormogaster* is polyphyletic and so is *Hormogaster pretiosa*, stressing the need of a taxonomic revision. *Vignysa* could be the ancestral form of the family, although the relations among genera are not clearly defined, as shown by the incongruence of results obtained among the different analyses. *Hemigastrodrilus* seems to be related to the *Hormogaster elisae* complex and both are found in the Atlantic drainage. *H. elisae* represents one evolutionary lineage with a high genetic diversity and five cryptic species (chapter V of this dissertation) that we propose as a new genus within Hormogastridae. Corsica and Sardinia seem to have been under two different genetic influences. The species located in Corsica and Northern Sardinia seem to be more related to *Vignysa*, whereas *H. pretiosa*, in the Southern area of Sardinia, where it was originally described and seems to be restricted to, is more closely related to some *Hormogaster* species from Northeast of Spain, where two different lineages are present. A molecular clock calibration of the tree using the separation of the Sardinian microplate (at 33 MY) indicated that the diversification of Hormogastridae may be very ancient, starting from 97 to 75 MY ago.

## VI.1. Introducción

La cuenca Mediterránea es un “hotspot” con un nivel excepcional de biodiversidad, que resulta muy interesante para realizar estudios biogeográficos y evolutivos, siendo una zona prioritaria para las políticas de conservación (Blondel y Aronson 1999, Myers *et al.* 2000).

Bouché (1972) propuso que las lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae ya estaban presentes en la Placa Ibérica en el Cretácico tardío, ocupando tierras que coincidirían a grosso modo con su área actual de distribución. El borde de esta Placa Ibérica sufrió cambios drásticos que afectaron a la Cordillera Bético-Rifeña, las Islas Baleares, las Kabilias, Córcega, Cerdeña y Calabria, véase Magri *et al.* (2007). Es en estas zonas de la primitiva Placa Ibérica y las tierras desgajadas donde se debe buscar para poder reconstruir la filogenia de los hormogástridos, que hasta el momento no se han encontrado en la Cordillera Bética ni en el Rif.

Como se ha comentado, la Familia Hormogastridae, está formada por cuatro géneros, 22 especies y ocho subespecies o variedades de lombrices de tierra, distribuidas casi exclusivamente en el área del Mediterráneo occidental (Díaz Cosín *et al.* 1989, Cobolli Sbordoni *et al.* 1992). Se trata de lombrices de tamaño mediano y grande que desempeñan un papel ecológico importantísimo en los sistemas edáficos mediterráneos (Bouché 1972).

Hasta el momento, el estudio de las relaciones filogenéticas en lombrices de tierra se ha llevado a cabo principalmente con base en los estudios morfo-anatómicos (Bouché 1972, Sims y Gerard 1999). Sin embargo, la taxonomía de estos animales es muy laxa, ya que los caracteres a tener en cuenta son pocos y muchos de ellos se solapan (Pop *et al.* 2003). Ya Álvarez (1977) advertía que podía haber confusiones en la identificación de hormogástridos debido sobre todo a errores en el número de espermatecas, provocado por la falta de madurez sexual total de los individuos a identificar o de su momento de reproducción. También señalaba que la extensión del clitelo y el grado de desarrollo de los tubérculos son caracteres que muchas veces pueden hacer pensar que entre los individuos hay diferencias específicas, siendo así que sólo se trata de diferencias de edad o grado de madurez sexual. Aunque la morfología

constituye la base de reconocimiento de una especie (Omodeo 1956, Bouché 1972, Qiu y Bouché 1998), el grado de homoplasia de los caracteres estudiados es generalmente elevado y se asocia a una plasticidad fenotípica presumiblemente importante, lo que implica que sólo nos permita una resolución débil de las relaciones filogenéticas y las agrupaciones son inciertas.

En los capítulos anteriores se ha detectado una evolución independiente y una alta diversidad del linaje de *Hormogaster elisae* presente en el centro de la Península Ibérica que plantea diferentes cuestiones. ¿Es la diversidad genética en toda la Familia del mismo rango que en este linaje? ¿Qué posición ocupa este linaje en la Familia? ¿Qué relación mantiene con el resto de especies y géneros? Ampliando estas preguntas nos hemos planteado una reconstrucción de la filogenia de los Hormogastridae con ayuda de marcadores moleculares. Asimismo se han realizado análisis de suelo de las localidades muestreadas para detectar alguna posible relación filogenética con los factores ambientales. Por último, se ha tratado de datar los eventos de diversificación de esta Familia con base en los eventos geológicos ocurridos en la cuenca mediterránea a lo largo de la historia.

## **VI.2. Materiales y métodos**

### **VI.2.1. Muestreo y estudio morfológico**

Se recogieron individuos de 20 de las 22 especies descritas de la Familia Hormogastridae durante campañas de muestreo realizadas en distintas localidades de la Península Ibérica, Francia continental, Córcega y Cerdeña mediante muestreo por excavación y separación manual. Se incluyeron además los especímenes recogidos para la elaboración del capítulo V, lo que hace un total de 45 localidades y 375 lombrices de tierra cliteladas (Tablas VI.1 y VI.2, Figura VI.1). En este estudio se incluye un ejemplar inmaduro cedido amablemente por Pietro Omodeo (HPA) analizado con alozimas por éste y otros autores en Cobolli Sbordoni *et al.* (1992), que está etiquetado como *Hormogaster pretiosa hispanica* y fue recogido a 100 m de la orilla del río Ter, aproximadamente a 9 Km de Gerona. Se intentó la amplificación de ejemplares de la Isla de Elba, Cerdeña y Francia enviados por este autor, pero el mal estado del ADN

tras tantos años de fijación en alcohol de 70° no lo permitió, por lo que la recomendación de Nagy (2010) de fijar el material biológico destinado a estudios moleculares en alcohol de 96° y conservar posteriormente en congelador a la temperatura más baja posible cobra todo su sentido.

Se incluye en este estudio la localidad (Ghilarza, Cerdeña, Italia) donde Rosa en 1887 encontró el primer hormogástrido (*Hormogaster redii redii*). Además, Magualida Ricoy nos cedió otro ejemplar de esta especie procedente de Alghero (Cerdeña, Italia). En Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España), se encontró una especie nueva cuya descripción se incluye como capítulo VIII en esta memoria. La localidad tipo de *Hormogaster multilamella* (Etxauri, Navarra, España) fue visitada en cuatro ocasiones pero a pesar de ello no fue posible capturar especímenes. También se intentaron amplificar los genes seleccionados a partir de un espécimen de esta especie fijado en formol, que fue amablemente cedido por El Museo de Zoología de la Universidad de Navarra, pero no fue posible debido al mal estado del ADN tras su conservación prolongada en este líquido. El formol inhibe el éxito de la PCR porque produce uniones de las proteínas que están asociadas con el ADN consigo mismas o con el propio ADN, lo que limita la cantidad de éste que está accesible para la amplificación por PCR (Schander y Halanych 2003, Boyle *et al.* 2004). En Talarn (Lérida, España) se capturaron ejemplares que no correspondían exactamente con la descripción morfológica de *Hormogaster lleidana* allí descrita por Qiu y Bouché (1998), así que hemos preferido dejarlos como *Hormogaster* sp. Estas dos, *H. multilamella* y *H. lleidana*, son las únicas especies descritas de Hormogastridae que no se han podido incluir en este estudio. Bouché basó sus descripciones morfológicas en un único adulto (*H. multilamella*) o en un adulto y un juvenil (*H. lleidana*), lo que podría explicar las dificultades para encontrar los especímenes en el primer caso y la no concordancia de caracteres morfológicos en el segundo. Los caracteres morfológicos de los individuos de Cervera del Maestre, coincidían con aquellos descritos por Zicsi en 1970, quien citó *Hormogaster pretiosa* en esa localidad. Estos caracteres no son exactamente los caracteres propios de *H. pretiosa*, cuya descripción realizó Michaelsen en 1899 y completó Omodeo en 1956. Para el estudio molecular se han dejado los individuos de esta localidad nominados como *H. pretiosa* con interrogación y en el capítulo VII, se discutirá esto con mayor detalle.



Los ejemplares se lavaron con agua destilada bajo la lupa y se conservaron en alcohol absoluto a -20°C. Se separó y limpió una porción de tegumento (0,025 g), eliminando las partículas de suelo y parásitos macroscópicos. A continuación, las muestras de tegumento se rehidrataron y se conservaron a -80°C hasta la extracción de ADN. Los especímenes se diseccionaron y examinaron morfológicamente para su determinación taxonómica prestando especial atención a las características más importantes para la sistemática de los Hormogastridae como describen Qiu y Bouché (1998).

Localidad	Abr.	Provincia, País	Especie	Abr. esp.	NCOI	N16S	NH3	NH4	N28S	N18S	Coordenadas	Altitud(m)
Alesanco (T)	ALE	La Rioja, España	<i>Hormogaster riojana</i>	H.rio	10	10	4	4	2	1	N42°26'21,7'' W002°50'18,4''	596
Alghero (N)	ALG	Sassari, Cerdeña, Italia	<i>Hormogaster redii redii</i>	H.red.	1	1	1	-	1	1	N40°35'59,9'' E008°17'56,7''	0
Banyuls Sur Mer (T)	BSM	Pyrénées-Orientales, Francia	<i>Hormogaster gallica</i>	H.gal	1	1	1	1	1	1	N42°28'08,0'' E003°09'08,2''	105
Biosca (T)	BIO	Lérida, España	<i>Hormogaster arenicola</i>	H.are	8	8	4	4	2	1	N41°51'04,6'' E001°19'40,4''	454
El Brull (T)	BRU	Barcelona, España	<i>Hormogaster catalaunensis</i>	H.cat	1	1	1	1	1	1	N41°48'04,9'' E002°20'51,6''	1145
Cervera del Maestre	CER	Castellón, España	<i>Hormogaster pretiosa?</i>	H.pre	8	8	4	4	2	1	N40°27'23,1'' E000°16'59,0''	214
Col de la Testa (T)	TES	Corse-du-Sud, Córcega, Francia	<i>Hormogaster samnitica lirapora</i>	H. sam.lir.	6	6	4	4	3	1	N41°28'24,4'' E009°06'08,6''	54
Ghilarza (T)	GHI	Oristano, Cerdeña, Italia	<i>Hormogaster redii redii</i>	H. red.	6	5	4	4	2	1	N40°06'58,9'' E008°51'53,3''	247
Graus (T)	GRA	Huesca, España	<i>Hormogaster eserana</i>	H. ese	8	8	4	4	2	1	N42°10'11,8'' E000°19'53,2''	454
Iglesias (N)	IGL	Carbonia-Iglesias, Cerdeña, Italia	<i>Hormogaster redii redii</i>	H. red.	8	8	4	4	2	1	N39°19'23,8'' E008°31'17,7''	276
Cardayre (T)	LAC	Lot-et-Garonne, Francia	<i>Hemigastrodrilus monicae</i>	He. mon	8	8	4	4	2	1	N44°18'46,8'' E000°52'45,0''	210
Loporzano (T)	LOP	Huesca, España	<i>Hormogaster huescana</i>	H. hue	8	8	3	4	2	1	N42°07'04,6'' W000°14'54,6''	558
Mende (T)	MND	Lozère, Francia	<i>Hemigastrodrilus monicae</i>	He. mon	8	8	4	3	2	1	N44°29'43,6'' E003°27'41,9''	710
Monrepós (T)	MON	Huesca, España	<i>Hormogaster pretiosiformis</i>	H. pfo	8	8	4	4	2	1	N42°23'26,0'' W000°22'20,9''	860
Montmajor (T)	MAJ	Barcelona, España	<i>Hormogaster sylvestris</i>	H. syl	2	2	2	2	2	1	N42°01'43,3'' E001°42'43,7''	785

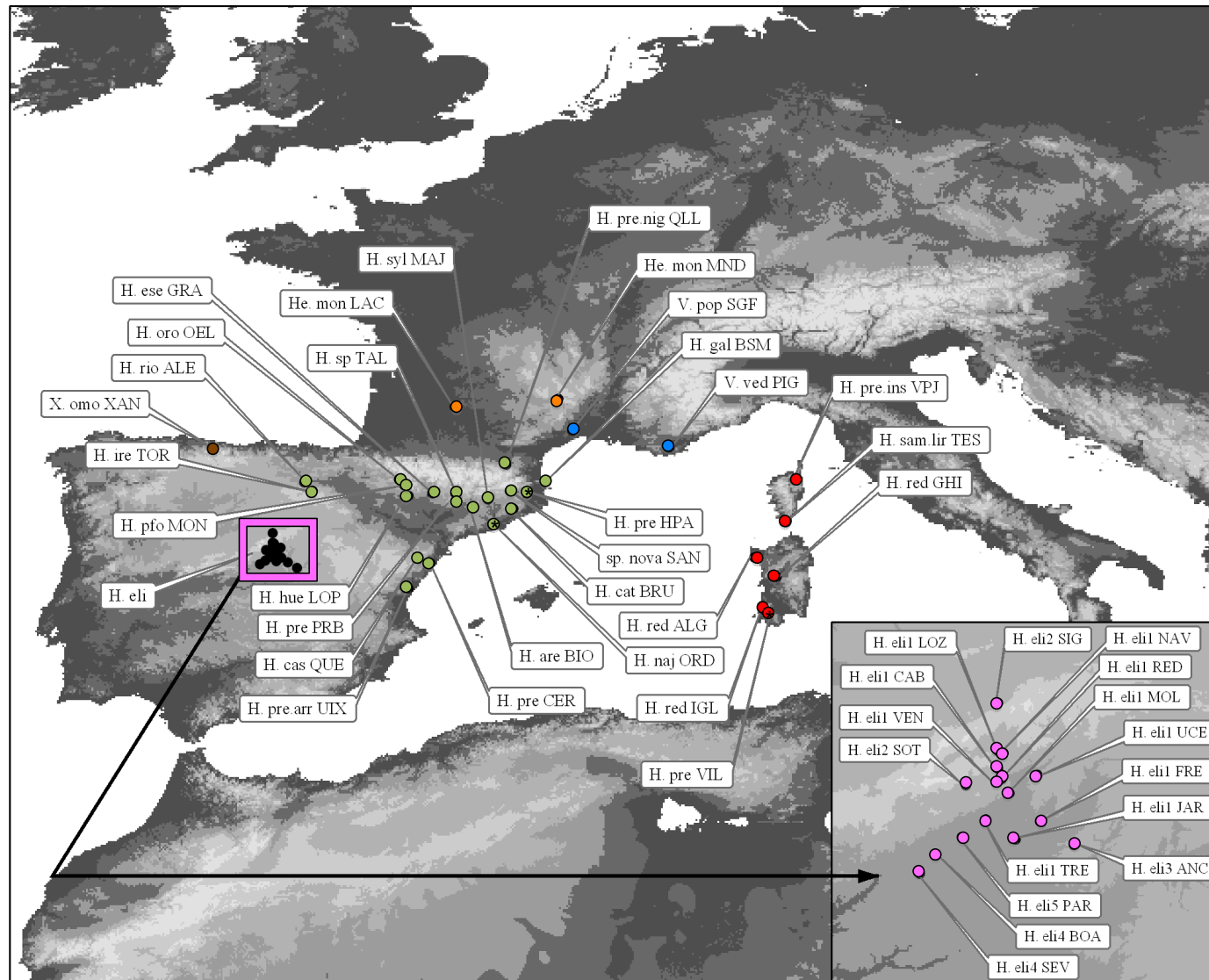
**Tabla VI.1.** (Continúa en página siguiente). Lista de localidades muestreadas por orden alfabético, especies determinadas en cada localidad y número de individuos utilizados para la secuenciación de cada gen. T: Localidad típica. N: cita nueva en esa localidad. Los individuos y localidades del complejo de *Hormogaster elisae* se muestran en la Tabla VI.2.

Localidad	Abr.	Provincia, País	Especie	Abr. esp.	NCOI	N16S	NH3	NH4	N28S	N18S	Coordenadas	Altitud(m)
Ordal (T)	ORD	Barcelona, España	<i>Hormogaster najaformis</i>	H. naj	6	7	4	4	2	1	N41°23'27,3'' E001°49'39,3''	391
Peña Oroel (T)	OEL	Huesca, España	<i>Hormogaster oroeli</i>	H. oro	8	8	4	4	2	1	N42°31'20,1'' W000°29'09,1''	1090
Peralba	PRB	Lérida, España	<i>Hormogaster pretiosa</i> var.	H. pre	2	2	2	2	2	1	N41°59'22,7'' E000°54'50,1''	740
Pignans (T)	PIG	Var, Francia	<i>Vignysa vedovinii</i>	V. ved	5	5	4	4	2	1	N43°18'04,6'' E006°12'35,9''	204
Puerto Querol (T)	QUE	Castellón, España	<i>Hormogaster castillana</i>	H. cas	8	8	4	4	2	1	N40°33'49,1'' W000°01'03,5''	957
Quillan (T)	QLL	Aude, Francia	<i>Hormogaster pretiosa nigra</i>	H. pre. nig	1	1	1	1	1	1	N42°52'48,8'' E002°10'12,0''	396
Saint- Gely-du-Fesc (T)	SGF	Hérault, Francia	<i>Vignysa popi</i>	V. pop	6	6	3	3	2	1	N43°42'19,0'' E003°48'03,7''	152
San Román (T)	XAN	Asturias, España	<i>Xana omodeoi</i>	X. omo	8	8	4	3	2	1	N43°15'20,9'' W005°05'10,3''	644
Sant Joan de les Abadesses (NE)	SAN	Gerona, España	Nueva especie	Sp. nova	8	8	4	4	2	1	N42°13'30,0'' E002°14'57,5''	735
Talarn	TAL	Lérida, España	<i>Hormogaster spp.</i>	H. sp.	3	3	3	3	2	1	N42°11'05,5'' E000°54'11,7''	464
Torrecilla en Cameros (T)	TOR	La Rioja, España	<i>Hormogaster ireguana</i>	H. ire	8	8	4	4	2	1	N42°13'54,7'' W002°37'35,2''	789
Vall d'Uixó (T)	UIX	Castellón, España	<i>Hormogaster pretiosa arrufati</i>	H. pre arr.	8	8	4	4	2	1	N39°49'39,4'' W000°15'40,2''	168
Villamassargia (T)	VIL	Carbonia-Iglesias, Cerdeña, Italia	<i>Hormogaster pretiosa</i>	H. pre	4	8	4	8	2	1	N39° 15'29,7'' E8° 40'17,3''	290
Volpajola (T)	VPJ	Haute-Corse, Córcega, Francia	<i>Hormogaster redii insularis</i>	H. red. ins	7	7	4	4	2	1	N42°31'18,6'' E009°21'05,7''	401
Río Ter	HPA	Gerona, España	<i>Hormogaster pretiosa</i>	H. pre	-	1	1	-	-	1	*	xx

**Tabla VI.1.** (Viene de página anterior). Lista de localidades muestreadas por orden alfabético, especies determinadas en cada localidad y número de individuos utilizados para la secuenciación de cada gen. T: Localidad típica. NE: Nueva especie. \* Este ejemplar fue donado por Pietro Omodeo, que nos proporcionó el nombre de la localidad, pero no sus coordenadas. Los individuos y localidades del complejo de *Hormogaster elisae* se muestran en la Tabla VI.2.

Localidad	Abr.	Abr. esp.	NCOI	N16S-tRNAs	NH3	NH4	N28S	N18S	Coordenadas	Altitud(m)
Anchuelo	ANC	H. eli 3	9	9	4	4	2	1	N40°28'50.2'' W3°14'33.5''	780
Boadilla del Monte	BOA	H. eli 4	12	12	4	4	2	1	N40°25'50.2'' W3°55'30.9''	667
Cabrera	CAB	H. eli 1	12	12	4	3	2	1	N40°51'25.9'' W3°37'18.2''	1029
Cubillo de Uceda	UCE	H. eli 1	12	12	4	3	2	1	N40°49'38.7'' W3°25'19.5''	883
Fresno del Torote	FRE	H. eli 1	2	2	2	2	2	1	N40°35'51.8'' W3°24'42.0''	660
Lozoyuela	LOZ	H. eli 1	22	22	7	6	2	1	N40°56'51.9'' W3°37'16.2''	1036
Molar	MOL	H. eli 1	12	12	9	8	2	1	N40°44'22.9'' W3°33'53.1''	753
Navas de Buitrago	NAV	H. eli 1	12	12	4	4	2	1	N40°56'21.0'' W3°35'38.1''	994
Paracuellos del Jarama	JAR	H. eli 1	12	11	4	4	2	1	N40°30'36.9'' W3°31'59.1''	674
Pardo	PAR	H. eli 5	12	7	3	4	2	1	N40°31'11.0'' W3°47'42.7''	662
Redueña	RED	H. eli 1	26	26	3	2	2	1	N40°48'46.7'' W3°36'06.2''	797
Sevilla la Nueva	SEV	H. eli 4	12	12	4	4	2	1	N40°20'41.9'' W4°00'48.9''	644
Siguero (T)	SIG	H. eli 2	11	11	4	5	2	1	N41°11'06.1'' W3°37'07.4''	1073
Soto del Real	SOT	H. eli 2	12	12	4	4	2	1	N40° 46'30.5'' W3°46'42.6''	985
Tres Cantos	TRE	H. eli 1	12	12	4	4	2	1	N40° 36'46.9'' W3°40'41.1''	675
Venturada	VEN	H. eli 1	12	12	4	4	2	1	N40° 48'07.7'' W3°37'19.6''	890

**Tabla VI.2.** Lista de localidades muestreadas donde se recogieron individuos pertenecientes al complejo *Hormogaster elisae*, especies determinadas en cada localidad (véase capítulo V, Abr. esp.) y número de individuos utilizados para la secuenciación de cada gen. T: Localidad típica.



**Figura VI.1.** Localidades donde se muestrearon los hormogástridos utilizados en este estudio. Se indica la abreviatura de la especie encontrada en cada localidad (véase Tabla VI.1 para el nombre completo de especies y localidades). Los colores se corresponden a los utilizados en los árboles filogenéticos en este capítulo. ORD, HPA y VIL se muestran con un asterisco por estar juntas en un clado fuera de su grupo más próximo geográficamente (véanse árboles filogenéticos más adelante).

**VI.2.2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación**

El ADN genómico total fue aislado a partir de una muestra de tejido de 0,025 g, utilizando el kit de extracción comercial DNeasy Tissue Kit (QIAGEN, IZASA, Barcelona, Spain) con dos eluciones de 70 µl de tampón. Los marcadores moleculares incluyeron las regiones mitocondriales de los genes COI, 16S y tRNA Leu Ala, y Ser, dos genes ribosómicos nucleares (18S completo y un fragmento del gen 28S) y dos genes nucleares codificantes de proteínas (histona H3 e histona H4). Los cebadores utilizados para amplificar estas regiones se muestran en la Tabla VI.3. Se intentó amplificar también el gen ITS (Internal Transcribed Spacer) en dos fragmentos con los cebadores:

9F: 5' GTAGGTGAACCTGCGGAAGG 3' (Carranza 1997)

5.8Srev: 5' GCGTTCAAAGACTCGATGATTC 3'

5.8Sfor: 5' GAATCATCGAGTCTTTGAACGC 3'

28Srev: 5' GTTAGTTTCTTTTCCTCCGCTT 3'

(Los tres últimos fueron diseñados en el laboratorio de Gonzalo Giribet, de la Universidad de Harvard, y están aún sin publicar).

Los dos primeros amplifican el fragmento ITS1 y los dos últimos amplifican el fragmento ITS2, pero sólo fue posible la amplificación consistente de ITS1 en dos de las poblaciones (CER: *H. pretiosa* y GRA: *Hormogaster eserana*), entre las que se detectaron dos cambios de bases.

La PCR (50 µl) incluyó 0,6 µl de la muestra de ADN, 1 µM de cada cebador, 200 µM de dNTPs (Invitrogen), 1X de tampón de PCR con 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems) y 1,25 unidades de enzima polimerasa AmpliTaq (Applied Biosystems). Se incluyó DMSO (1 µl) para la amplificación del gen 28S. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Multicycler Ep gradient (Eppendorf) e incluyó un paso inicial de desnaturalización (5 minutos a 95°C) seguido de 35 ó 40 ciclos incluyendo desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, unión del cebador (en un rango desde 49°C a 60°C) durante 30 segundos ó 1 minuto, y extensión a 72°C durante 1 minuto, con un paso de extensión final a 72°C durante 7 minutos. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y tinción con

bromuro de etidio y se purificaron usando las placas MultiScreen y una caja de vacío (Vacuum Manifold, Millipore). Los productos purificados se secuenciaron directamente con el mismo par de cebadores que se usaron para la amplificación. Cada reacción de secuenciación contenía un volumen total de 10 µl incluyendo 3 µl del producto de PCR, 0,32 µM de uno de los cebadores de la PCR, 0,25 µl de tampón de secuenciación ABI BigDye 5X sequencing y 0,5 µl de ABI BigDye Terminador (Applied Biosystems). Las reacciones de secuenciación incluyeron un paso inicial de desnaturalización (5 minutos a 95°C), y 30 ciclos (95°C durante 10 segundos, 50°C durante 5 segundos, y 60°C durante 4 minutos). Los productos de la PCR marcados con BigDye se limpiaron usando placas Performa DTR (Edge Biosystems, Gaithersburg, MD, USA). Los productos de la reacción de secuenciación se analizaron por último usando el ABI Prism 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los cromatogramas se revisaron con el programa SEQUENCHER v. 4.7 (Gene Codes Corporation, Am Arbor, MI, USA) para obtener las secuencias definitivas, que se compararon en GenBank mediante el algoritmo de búsqueda BLAST (Altschul *et al.* 1997) y se alinearon con CLUSTALX v. 2.0.12 (Thompson *et al.*, 1997).

### **VI.2.3. Análisis de datos moleculares**

#### **VI.2.3.a. Variabilidad genética**

Las estimas de variabilidad se computaron en los programas DnaSP v. 4.5 (Librado y Rozas 2009) y ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Muchas de las secuencias de ambas histonas presentaban una indeterminación, con dos bases posibles, por lo que se trataron como “unphased data” en DnaSP, en el que se identificaron los alelos y se crearon los archivos para los consiguientes análisis de variabilidad genética.

La variación dentro de poblaciones se expresa como diversidad haplotípica ( $H$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), y número de posiciones polimórficas ( $S$ ). La diferenciación genética media entre y dentro de poblaciones se estimó utilizando el modelo de evolución de secuencia de Kimura 2-parámetros (1980) con el objeto de comparar estos resultados con los obtenidos en estudios previos.

Región amplificada (tamaño en pb.)	Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Referencia
COI (648)	LCO1490 HCO2198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer 1994
16S-tRNAs (759-793)	16S-tRNA-Leu-Ala-Ser-Leu-LumbF2 Ho 16sRa:	CGACTGTTTAACAAAAACATTGC GCACTATTCTGCCAYCTTGT	Pérez-Losada <i>et al.</i> 2009 Capítulo V, esta memoria
18S (1701)	1F 4R 3F 18Sbi 18Sa2.0 9R	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG GAATTACCGCGGCTGCTGG GTTCGATTCCGGAGAGGGA GAGTCTCGTTTCGTTATCGGA ATGGTTGCAAAGCTGAAAC GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	Giribet <i>et al.</i> 1996, Whiting <i>et al.</i> 1997
28S (738-739)	28S-F1 28S-R1	GAGTACGTGAAACCGTCTAG CGTTTCGTCCCAAGGCCTC	Pérez-Losada <i>et al.</i> 2009
H3 (328)	H3a F H3a R	ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC	Colgan <i>et al.</i> 1998
H4 (183)	H4F-2S H4F-2er	TSCGIGAYAACATYCAGGGIATCAC CKYTTIAGIGCRTAIACCACRTCCAT	Pineau <i>et al.</i> 2005

**Tabla VI.3.** Secuencias de los cebadores utilizados para amplificar y secuenciar los fragmentos de genes utilizados en este estudio. pb. pares de bases.



**VI.2.3.b. Relaciones filogenéticas**

Debido a los requerimientos computacionales de estos análisis, se seleccionó un individuo de cada localidad como representante para elaborar los árboles filogenéticos, tras comprobar que todos los haplotipos de la misma localidad aparecían agrupados en el árbol.

Se incluyeron secuencias del poliqueto *Arenicola marina* como grupo externo y otros grupos de anélidos como referencia. Las secuencias fueron amablemente cedidas por el Profesor Gonzalo Giribet y en algunos casos se obtuvieron de la base de datos GenBank (véase Tabla VI.4). En ningún caso fue posible obtener la secuencia de H4, salvo para *Aporrectodea trapezoides*, elaborada en nuestro laboratorio.

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante optimización directa (Wheeler 1996), usando parsimonia (MP) como criterio de optimización en el programa POY v. 4.1 (Varón *et al.* 2009) y sin alineamiento previo. La búsqueda de árboles más parsimoniosos se llevó a cabo mediante una combinación de unión aleatoria de secuencias (random addition of sequences) con SPR (Subtree Pruning and Regrafting) y cambio de ramas mediante TBR (Tree Bisection and Reconnection) seguido por múltiples rondas de “tree fusing” (Goloboff 1999, 2002). Los genes codificantes de proteínas (COI, H3 y H4) se consideraron como “pre-aligned”, ya que por no presentar diferencias de tamaño su alineamiento era trivial.

Se llevó a cabo un análisis de sensibilidad utilizando diez combinaciones de parámetros, en las que se variaban las contribuciones relativas de los “indels” (inserciones y deleciones) y de las transformaciones de las bases (Wheeler 1995) y se utilizó un índice de congruencia para seleccionar la combinación óptima. Para realizar este análisis de sensibilidad, los datos fueron analizados en combinación y para cada partición independiente. El soporte de los nodos se realizó mediante el procedimiento de remuestreo de Bootstrap (Felsenstein 1985) con 100 pseudoréplicas.

Se realizó también un análisis filogenético clásico de dos pasos. Las secuencias se alinearon con CLUSTALX v. 2.0.12 (Thompson *et al.* 1997) y se concatenaron con PHYUTILITY (Smith y Dunn 2008). Se utilizó el programa JMODELTEST v. 0.1.1

(Posada 2008) para seleccionar el modelo evolutivo que mejor explicaba los datos. Se utilizó el criterio de información de Akaike (AIC; Akaike 1973) para seleccionar entre los modelos disponibles.

Se realizó una estima de la filogenia mediante el método bayesiano (BI) utilizando el programa MRBAYES v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para la matriz concatenada, se especificaron los modelos de sustitución de nucleótidos seleccionados por JMODELTEST para cada partición y se permitió que las estimas de sustitución variasen de forma independiente en cada partición. El soporte de los clados se estimó usando el algoritmo de Monte Carlo a partir de simulaciones de cadenas de Markov. Los parámetros en MRBAYES se fijaron a dos millones de generaciones y muestreo cada generación 500, obteniendo 4.000 árboles, utilizando la característica por defecto de empezar el análisis con un árbol aleatorio. El análisis se realizó dos veces y se desecharon como “burn in” todos los puntos de muestreo anteriores a la fase de estabilización. El resto de los árboles se combinaron para encontrar la estima de la filogenia con máxima probabilidad *a posteriori*. Como se detectaron patrones de saturación en las terceras posiciones del codon en COI y H3 usando el programa DAMBE (Xia y Xie 2001), el árbol fue construido también sin estas posiciones.

Los análisis de Máxima verosimilitud (Maximum-likelihood, ML) se llevaron a cabo en PHYML v. 2.4.4 (Guindon y Gascuel 2003), dejando que el programa optimizara los valores de  $\alpha$  e I. El soporte de los clados se evaluó mediante el procedimiento estándar de Bootstrap (Felsenstein 1985) con 1.000 réplicas.

Por último, se elaboraron árboles con los fragmentos de origen mitocondrial y nuclear por separado. Para ello se utilizó el programa MRBAYES y sus ajustes indicados para el análisis general.

Espece	Clasificación	COI	16S	H3	H4	28S	18S
<i>Arenicola marina</i>	Polychaeta, Scolecida, Capitellida, Arenicolidae	GG	GG	GG	-	GG	GG
<i>Hirudo verbana</i>	Clitellata, Hirudinida, Hirudinea, Arhynchobdellida, Hirudiniformes, Hirudinidae	GG	GG	GG	-	GG	GG
<i>Aulophorus furcata</i> (= <i>Dero furcata</i> )	Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Tubificina, Naididae	GG	GG	GG	-	GG	GG
<i>Aelosoma sp.</i>	Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Lumbricina, Aeolosomatidae	GG	GG	GG	-	GG	GG
<i>Amyntas robustus</i>	Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida, Lumbricina, Megascolecidae	EF077569.1	EF490524.1	-	-	EF490529.1	-
<i>Dichogaster saliens</i>		-	AF406573.1	-	-	AY101560.1	AY365463.1
<i>Pontodrilus litoralis</i>		-	AY340473.1	-	-	-	AY365462.1
<i>Lumbricus terrestris</i>	Clitellata, Oligochaeta, Haplotaxida,	GG	U24570	GG	-	GG	GG
<i>Aporrectodea trapezoides</i>	Lumbricina, Lumbricidae	RF	Este estudio	Este estudio	Este estudio	RF	Este estudio

**Tabla VI.4.** Anélidos utilizados como grupos externos en los análisis filogenéticos. GG: Secuencia cedida por Gonzalo Giribet. RF: Secuencia cedida por Rosa Fernández. Se indica el número de acceso de GenBank en aquellos casos en los que la secuencia se obtuvo en esta base de datos.

**VI.2.3.c. Estima de tasas moleculares y tiempos de divergencia**

Para la calibración del árbol filogenético se utilizó el punto de separación entre *H. pretiosa* de Cerdeña (VIL) y las especies continentales unidas en su mismo clado: *H. pretiosa* procedente de las orillas del río Ter (HPA) y *Hormogaster najaformis* (ORD). Es posible que estos linajes se diferenciaron de forma alopátrida cuando las microplacas de Cerdeña se separaron de la Europa continental debido a movimientos tectónicos. Esto se puede asumir en este caso debido a la escasa capacidad de dispersión de estos animales (Ligthart y Peek 1997, Hale *et al.* 2005), que tienden a permanecer en los mismos sitios durante largos periodos de tiempo, siguiendo el destino de su hábitat y área geográfica (Omodeo y Rota 2008). Esto se ve magnificado en este caso por la naturaleza endogea de los hormogástridos, aunque no se puede descartar una diferenciación con anterioridad. Por ello, se ha seleccionado la fecha más antigua con la que los últimos estudios datan la separación de las microplacas Mediterráneas occidentales: 33 millones de años (Schettino y Turco 2006). La separación no comenzó antes de esta fecha y se prolongó hasta los 25 millones de años. El uso de 33 millones de años es más correcto, dado que la separación de los linajes podría haber comenzado incluso con anterioridad a la ruptura de las placas y por ello, representa una edad mínima de separación de dichos linajes.

En primer lugar, se realizó una prueba para comprobar si nuestros datos se ajustaban o no a un reloj molecular (tasa de sustitución constante), es decir, si existía o no una diferencia significativa entre el árbol con la longitud de ramas obtenidas de acuerdo al modelo generado por JMODELTEST y el árbol filogenético inferido con este modelo pero con la restricción de que las ramas evolucionen de acuerdo a un reloj molecular. Para ello, se introdujeron en PaupUP v. 4.0b10 (Swofford 2002, Calendini y Martin 2005) el árbol generado por inferencia Bayesiana y los parámetros del modelo evolutivo utilizado y se calculó su verosimilitud bajo la asunción de un reloj molecular y sin ella. Estos valores de verosimilitud se compararon mediante un “likelihood-ratio test” en JMODELTEST. El test resultó significativo por lo que los árboles comparados resultaron diferentes, es decir, el árbol filogenético no se ajustaba a un reloj molecular (las tasas de sustitución varían a lo largo de las ramas). Por ello, la calibración se llevó a cabo con el programa R8S v. 1.71 (Sanderson 1997, 2006). En primer lugar se utilizó el algoritmo TN (Truncated Newton) para llevar a cabo una prueba de “cross-validation”,

con ocho factores de “smoothing”. A continuación se calcularon los tiempos de divergencia utilizando el método PL (Penalized Likelihood) con el valor de “smoothing” óptimo y fijando la edad de separación de *H. pretiosa* continental y *H. pretiosa* de Cerdeña en 33 millones de años. Se repitieron los análisis incluyendo y excluyendo los grupos externos y con el árbol de máxima verosimilitud generado por PHYML para estudiar su sensibilidad. Asimismo se realizó este análisis a partir de los datos tratados con POY. La combinación óptima de parámetros (221) se utilizó en este programa para generar un “implied alignment” (Wheeler 2003, Giribet 2005). Éste se introdujo en el programa PAUP 4.0b3 (Swofford 2002) para calcular la longitud de las ramas y finalmente se estimaron los tiempos de divergencia con R8S.

Se calculó la tasa de sustitución del gen COI por separado, debido a su importancia como código de barras y su uso extendido para análisis demográficos y de genética de poblaciones. Además, en este caso, nos permite comprobar si la tasa utilizada en el capítulo IV, que fue calculada para megascolécidos, es válida para los hormogástridos. Para ello, se construyó un árbol filogenético con el programa MRBAYES y el modelo evolutivo indicado por JMODELTEST para este gen. Se siguió el mismo procedimiento con el programa R8S, pero esta vez se pusieron además constricciones en otros puntos del árbol teniendo en cuenta los resultados de la datación del árbol general. En este caso se excluyeron todos los grupos externos.

#### **VI.2.4. Evaluación de factores del suelo**

Al igual que en el capítulo anterior, se midieron algunos factores del suelo en las localidades muestreadas con el objetivo de explorar si las diferencias en el tipo de suelo juegan un papel importante en la diversidad de este grupo de lombrices de tierra. Estos factores se seleccionaron porque en la bibliografía se mencionan habitualmente como algunos de los que más afectan a la distribución de las lombrices de tierra (Edwards y Bohlen 1996, Hernández *et al.* 2003). Se determinaron la textura del suelo y el pH como se describe en Guitián y Carballas (1976). El contenido total en nitrógeno se determinó mediante el método de Kjeldahl como se indica en Page *et al.* (1982) y se expresó en porcentaje. El análisis de carbono orgánico oxidable se basó en el método de Anne

(1945), adaptado para un lector de microplacas (Microplate Biorad, 590 nm), en el que se utilizó glucosa como estándar y expresando los resultados en porcentaje.

Se implementó un test de Mantel (1967) en ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005) para estudiar la correlación entre las distancias genéticas entre localidades ( $\Phi_{ST}$  con la corrección de Kimura 2-parámetros) de los genes más variables (COI, 16S-tRNA, H3, H4) con las diferencias de los factores del suelo entre dichas localidades (en valor absoluto). Los valores de significación de las correlaciones entre matrices se evaluaron realizando 10.000 permutaciones. Se realizó además un análisis de componentes principales con los factores del suelo, lo que permite observar de una forma más directa y visual sus variaciones entre las localidades muestreadas y ver así, si el tipo de suelo influye sobre la especie o género que es capaz de desarrollarse en cada localidad (STATISTICA v. 6.1, StatSoft, Inc. (2001), <http://www.statsoft.com>).

### **VI.3. Resultados**

#### **VI.3.1. Características morfológicas**

Con un estudio morfológico exhaustivo de los ejemplares se asignaron los individuos recogidos en cada localidad a una especie concreta. Los resultados de esta identificación se muestran en la Tabla VI.1. En las Figuras de la VI.2 a la VI.6 se pueden ver algunas características morfológicas. A continuación se indica una clave para identificar los distintos géneros y especies de *Vignysa* y se incluye un cuadro con los caracteres identificativos de las especies de *Hormogaster* (Tabla VI.5). Para conocer las características de la especie nueva encontrada en la localidad de Sant Joan de les Abadesses, y para una descripción y discusión más detallada de los mismos, véase el capítulo VIII.

CLAVE DE GÉNEROS:

1. Dos mollejas anteriores en 6, 7 (6/7)..... 2  
Tres mollejas anteriores en 6, 7, 8.....**Subfamilia Hormogastrinae**
2. Con glándulas de Morren rudimentarias. Tiflosol que llega a tener 12 láminas.....**Subfamilia Xaninae: *Xana omodeoi***  
Sin glándulas de Morren. Tiflosol con 2-5 láminas.....**Subfamilia Vignysinae**

**Subfamilia Hormogastrinae**

Poros femeninos en el área entre las quetas *b* y *c*. Molleja posterior reducida.....***Hormogaster***

Poros femeninos en el área entre las quetas *a* y *a*. Sin molleja posterior.....***Hemigastrodrilus: Hemigastrodrilus monicae***

**Subfamilia Vignysinae**

Con vesículas sanguíneas subparietales, espermatecas simples.....***Vignysa popi***

Sin vesículas sanguíneas subparietales, espermatecas con varios acúmulos de esperma.....***Vignysa vedovinii***

Especie identificada	Códigos localidad	Posición clítelos	Posición tubérculos	Espermatecas	Láminas tiflosol	Otros caracteres
<i>H. redii redii</i> <b>Rosa, 1887</b>	ALG GHI IGL	13,14-24,25	17,18,19- 24,25	(9/109, 10/11, 11/12 Sésiles, pequeñas	7	quetas <i>ab</i> separadas, <i>cd</i> geminadas (25:10:8:1:30)
<i>H. pretiosa pretiosa</i> <b>Michaelsen, 1899</b>	VIL	(12, 13), 14-30	22-26, 27	9/10 y 10/11 Múltiples, en grupos de 2-6	11	
<i>H. pretiosa pretiosa</i> <b>(Cita de Zicsi 1970)</b>	CER	(13-14)15-30	21-29	8/9, 9/10, 10/11 Sésiles, pequeñas	19-20	
<i>H. pretiosa</i> <b>(Omodeo leg.)*</b>	HPA	13- 29,30,31,36,37	22,23- 26,27	9/10 y 10/11 Múltiples, en anillo	15	
<i>H. pretiosa nigra</i> <b>Bouché, 1970</b>	QLL	15-30	22-28 (1/2 29)	9/10,10/11 Multiloculares	14-15	
<i>H. redii insularis</i> <b>Bouché, 1970</b>	VPJ	13,14-24,25	15,16-28, 29	10/11, 11/12 y 12/13 Simples, grandes	7-9	
<i>H. samnitica lirapora</i> <b>Bouché, 1970</b>	TES	13,14-23	17-25	(9/10) 10/11, 11/12, 12/13,(13/14) múltiples 8/9, 9/10 y 10/11	7 a 8	
<i>H. pretiosiformis</i> <b>Zicsi, 1970</b>	MON	15-27	19, 20-26, 27	(Zicsi también en 11/12) Simples	19	
<i>H. oroeli</i> <b>Álvarez, 1971</b>	OEL	14, 15-26, 27	19, 20-26, 27	8/9, 9/10 y 10/11 Simples	19	
<i>H. elisae</i> <b>Álvarez, 1977</b>	Poblaciones del centro de la Península.	(13)14(15)- 26(27)28.	22(23)- 25(26)	9/10, 10/11 Tubulares	5	
<i>H. pretiosa arrufati</i> <b>Álvarez, 1977</b>	UIX	(13)14-30	(20) 21- 28 (29)	9/10 y 10/11 Simples	23	
<i>H. gallica</i> <b>Rota, 1993</b>	BSM	14-30	(23)24-27	9/10,10/11, Multiloculares?	13	Segmentos anteriores muy carenados

**Tabla VI.5.** (Continúa en página siguiente). Principales características morfológicas que se observaron en los ejemplares de *Hormogaster* capturados y especie asignada. Véase el capítulo VII para más detalle en los caracteres morfológicos y comparación entre especies.\* Caracteres tomados de Cobolli Sbordoni *et al.* (1992).



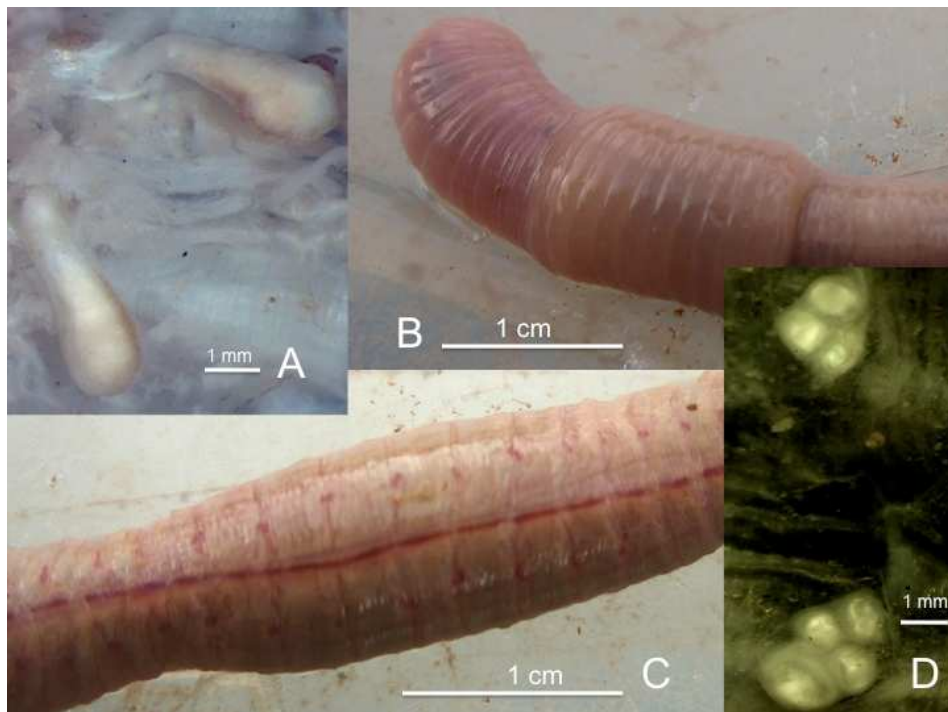
## VI. Filogenia molecular de Hormogastridae

<b>Especie identificada</b>	<b>Códigos localidad</b>	<b>Posición clítel</b>	<b>Posición tubérculos</b>	<b>Espermatecas</b>	<b>Láminas tiflosol</b>	<b>Otros caracteres</b>
<i>H. riojana</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	ALE	13,14,17-27,28 En silla,	(20)21-27 Banda fina	9/10 y 10/11, Multiloculares	15	
<i>H. ireguana</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	TOR	13-27	19-26	8/9, 9/10, 10/11 Multiloculares	19	
<i>H. eserana</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	GRA	14-30	22-28	9/10, 10/11 Simples	17	Poróforos muy reducidos
<i>H. huescana</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	LOP	15-30	21,22-28,29(30)	9/10, 10/11 Simples	17	
<i>H. arenicola</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	BIO	14-28	19-26	9/10, 10/11 Simples	15	
<i>H. catalaunensis</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	BRU	½ 14-30(31)	22-28	9/10, 10/11, Multiloculares	11	
<i>H. sylvestris</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	MAJ	15-28 En anillo	22-27	9/10-10/11 Multiloculares	13	
<i>H. najaformis</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	ORD	13-31 En anillo	19, 20-26 En salientes muy desarrollados	10/11,11/12 (nuestro material) 9/10, 10/11 (Qiu y Bouché). Múltiples	17	
<i>H. castillana</i> <b>Qiu y Bouché, 1998</b>	QUE	½ 14,15-29 (1/2 30)	22-28	9/10, 10/11 Simples	21-23 (nuestro material) 18 (Qiu y Bouché)	
<i>H. pretiosa</i> var. <b>Michaelsen, 1925</b>	PRB	12, 13,14-30,31	23-28 (29)	9/10 y 10/11 Simples	17-18	
<i>Hormogaster</i> sp.	TAL	15-30	21-27	8/9, 9/10 y 10/11 Simples	19	
<i>Sp nova</i>	SAN	14, 15-27 (28)	(20) 21,22-26,27	8/9,9/10,10/11 Multiloculares	15	

**Tabla VI.5.** (Viene de página anterior) Principales características morfológicas que se observaron en los ejemplares de *Hormogaster* capturados y especie asignada. Véase el capítulo VII para más detalle en los caracteres morfológicos y comparación entre especies.



**Figura VI.2.** Características morfológicas de *Xana omodeoi* (A). B: Detalle de un par de espermatecas; C: Detalle de su tiflosol.



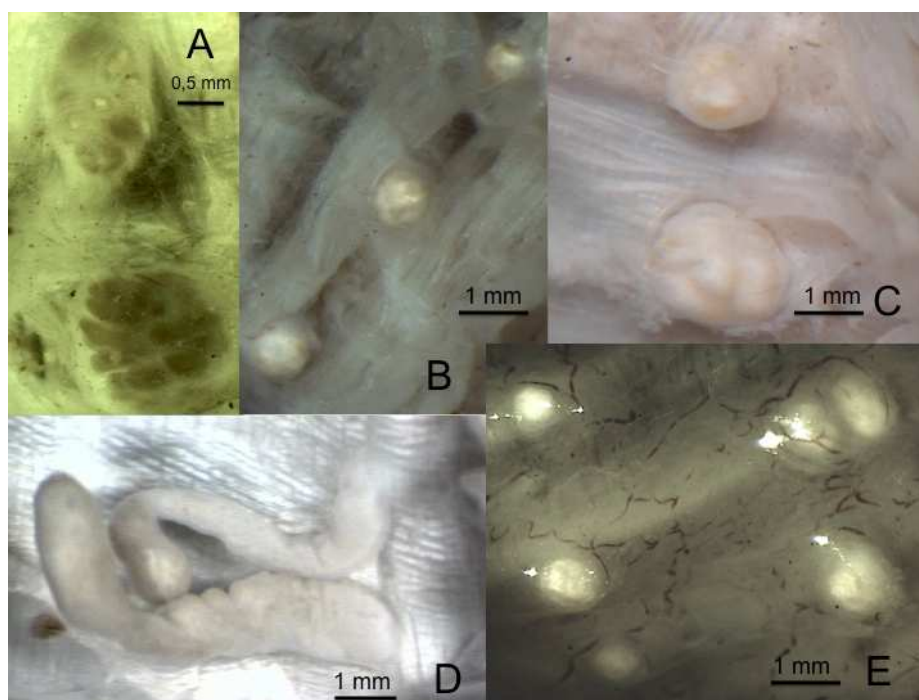
**Figura VI.3.** Características morfológicas de *Vignysa*. A: Detalle de un par de espermatecas de *V. popi*; B: Parte anterior de un ejemplar de *V. popi* recogido en la localidad de Saint Gely du Fesc (Francia); C: Detalle de las vesículas sanguíneas de *V. popi*; D: Detalle de un par de espermatecas de *V. vedovinii*.



**Figura VI.4.** Características morfológicas de *Hemigastrodrilus monicae*. A: Detalle de los poros femeninos (señalados por las flechas), localizados en la zona ventral del cuerpo; B: ejemplar de *He. monicae* recogido en la localidad de Cardayre (Francia); C: Detalle de las glándulas de Morren; D: Detalle de un par de espermatecas.



**Figura VI.5.** Ejemplares de *Hormogaster redii insularis* (A: Volpajola, Córcega, Francia) y *Hormogaster samnitica lirapora* (B: Col de la Testa, Córcega, Francia).



**Figura VI.6.** Detalle de las espermatecas de distintas especies descritas de *Hormogaster*. A: *H. pretiosa nigra*, recogida en Quillan (Francia); B: *H. redii insularis*, recogida en Volpajola (Córcega, Francia); C: *H. riojana*, recogida en Alesanco (España); D: *H. elisae*, recogida en Siguero (España); E: *H. samnitica lirapora*, recogida en Col de la Testa (Córcega, Francia).

### VI.3.2. Datos moleculares

#### VI.3.2.a. Características de los genes utilizados y variabilidad genética

En la Tabla VI.6 se muestran los valores de variabilidad genética para el conjunto de datos global de los hormogástridos analizados. La diversidad encontrada fue muy alta. Las regiones mitocondriales (COI y 16S-tRNA) resultaron ser las más variables mostrando un porcentaje de divergencia media entre las secuencias de 13-16%. Los genes nucleares resultaron menos variables, con una divergencia media alrededor del 3% en las histonas y del 2% en el 28S. El fragmento menos variable fue el 18S, con tan sólo 20 posiciones variables entre las 1.701 analizadas y un 0,23% de divergencia media. Sólo se encontraron inserciones o deleciones en las secuencias de los genes 16S-tRNA y 28S. En la Tabla VI.7 se muestran las frecuencias nucleotídicas. El contenido de A+T fue mayor en los genes mitocondriales, mientras que los genes nucleares presentaron un mayor contenido en G+C.

Las estimas de variabilidad genética para los genes más variables se muestran en las Tablas de los Anexos III, IV, V, VI (COI, 16S-tRNA, H3, H4, respectivamente), y las tablas de divergencia genética entre localidades se muestran en los Anexos VII, VIII, IX, X (mismo orden).

	COI	16S-tRNA	H3	H4	28S	18S
<b>N</b>	375	374	166 (332)	164 (328)	87	46
<b>NHAP</b>	170	162	65	37	36	19
<b>H</b>	0,99 (0,0001)	0,99 (0,001)	0,98 (0,002)	0,92 (0,01)	0,93 (0,02)	0,90 (0,03)
<b><math>\pi</math></b>	0,164 (0,078)	0,136 (0,065)	0,035 (0,018)	0,028 (0,015)	0,020 (0,010)	0,002 (0,001)
<b>Posiciones</b>	648	808	328	183	739	1701
<b>Gaps</b>	0	78	0	0	3	0
<b>S</b>	266	380	68	32	74	20
<b>Ts</b>	366	358	59	31	50	19
<b>Tv</b>	148	214	36	16	40	2
<b>Sustituciones</b>	514	572	95	47	90	21
<b>Dp (N)</b>	106,35 (45,77)	110,20 (47,41)	11,47 (5,21)	5,12 (2,49)	15,15 (6,84)	3,87 (1,98)
<b>Dp (%)</b>	16,41 (7,06)	13,64 (5,87)	3,50 (1,59)	2,80 (1,36)	2,05 (0,92)	0,23 (0,12)

**Tabla VI.6.** Valores de diversidad genética y variación de los fragmentos de genes utilizados en el análisis para las muestras de Hormogastridae. N: Número de individuos analizados (en el caso de las histonas se computan dos alelos por individuo, debido a la presencia de posiciones con indeterminaciones de dos bases). NHAP: Número de haplotipos identificados; H: Diversidad haplotípica;  $\pi$ : Diversidad nucleotídica; S: Número de posiciones polimórficas; Ts: Número de transiciones; Tv: Número de transversiones; Dp: Número medio de diferencias por pares (N: número total; %: porcentaje). Entre paréntesis la varianza de las estimas.

	COI	16S-tRNA	H3	H4	28S	18S
<b>C</b>	22,47%	18,14%	33,39%	33,35%	30,50%	23,30%
<b>T</b>	31,38%	27,60%	13,99%	16,84%	15,82%	24,12%
<b>A</b>	27,35%	35,84%	20,65%	21,31%	17,10%	24,73%
<b>G</b>	18,80%	18,42%	31,97%	28,50%	36,58%	27,85%
<b>A+T</b>	58,73%	63,44%	34,64%	38,15%	32,92%	48,85%
<b>G+C</b>	41,27%	36,56%	65,36%	61,85%	67,08%	51,15%

**Tabla VI.7.** Frecuencias nucleotídicas medias en los distintos genes en las secuencias de los hormogástridos.



## VI.3.2.b. Relaciones filogenéticas

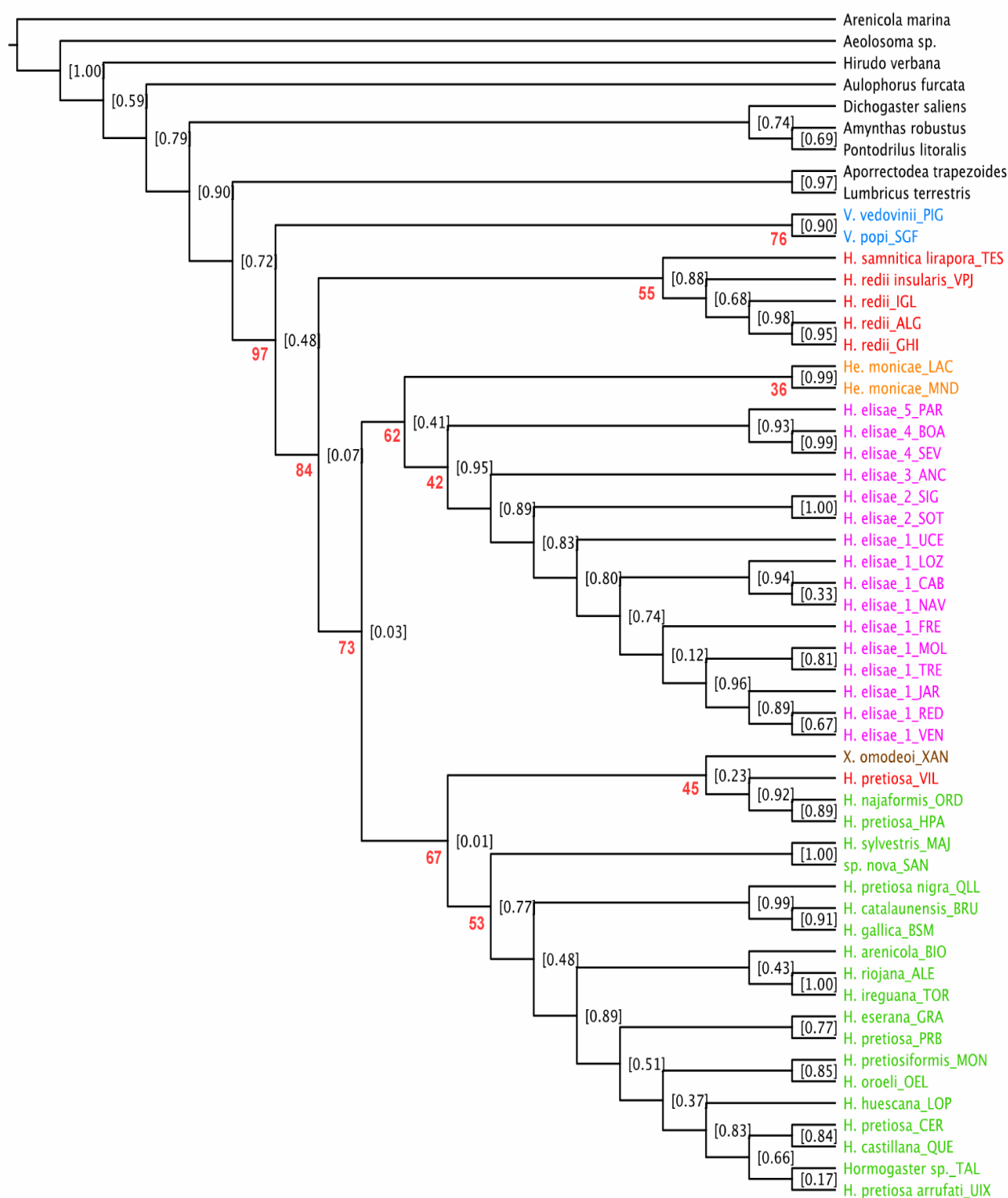
En los análisis de parsimonia mediante optimización directa (con el programa POY), la combinación de parámetros que minimizaba la incongruencia entre particiones resultó ser “221” (Tabla VI.8). Aplicando esta combinación óptima, se encontró un único árbol con coste 10.933 que se muestra en la Figura VI.7 con los valores de Bootstrap indicados en las ramas.

	COI	16S-tRNA	H3	H4	28S	18S	Todos	ILD
<b>111</b>	2927	2210	324	57	651	637	6980	0,02493
<b>121</b>	4059	3332	479	81	1009	964	10150	0,02227
<b>141</b>	6273	5492	779	127	1679	1592	16332	0,02388
<b>211</b>	2927	2457	324	57	737	732	7415	0,02441
<b>221</b>	4059	3771	478	81	1154	1152	10933	<b>0,02177</b>
<b>241</b>	6273	6353	779	127	1970	1970	17872	0,02238
<b>411</b>	2927	2811	324	57	839	905	8066	0,02517
<b>421</b>	4059	4457	479	81	1358	1495	12197	0,02197
<b>441</b>	6273	7700	779	127	2383	2654	20396	0,02353
<b>3221</b>	2927	2701	324	57	810	797	7798	0,02334

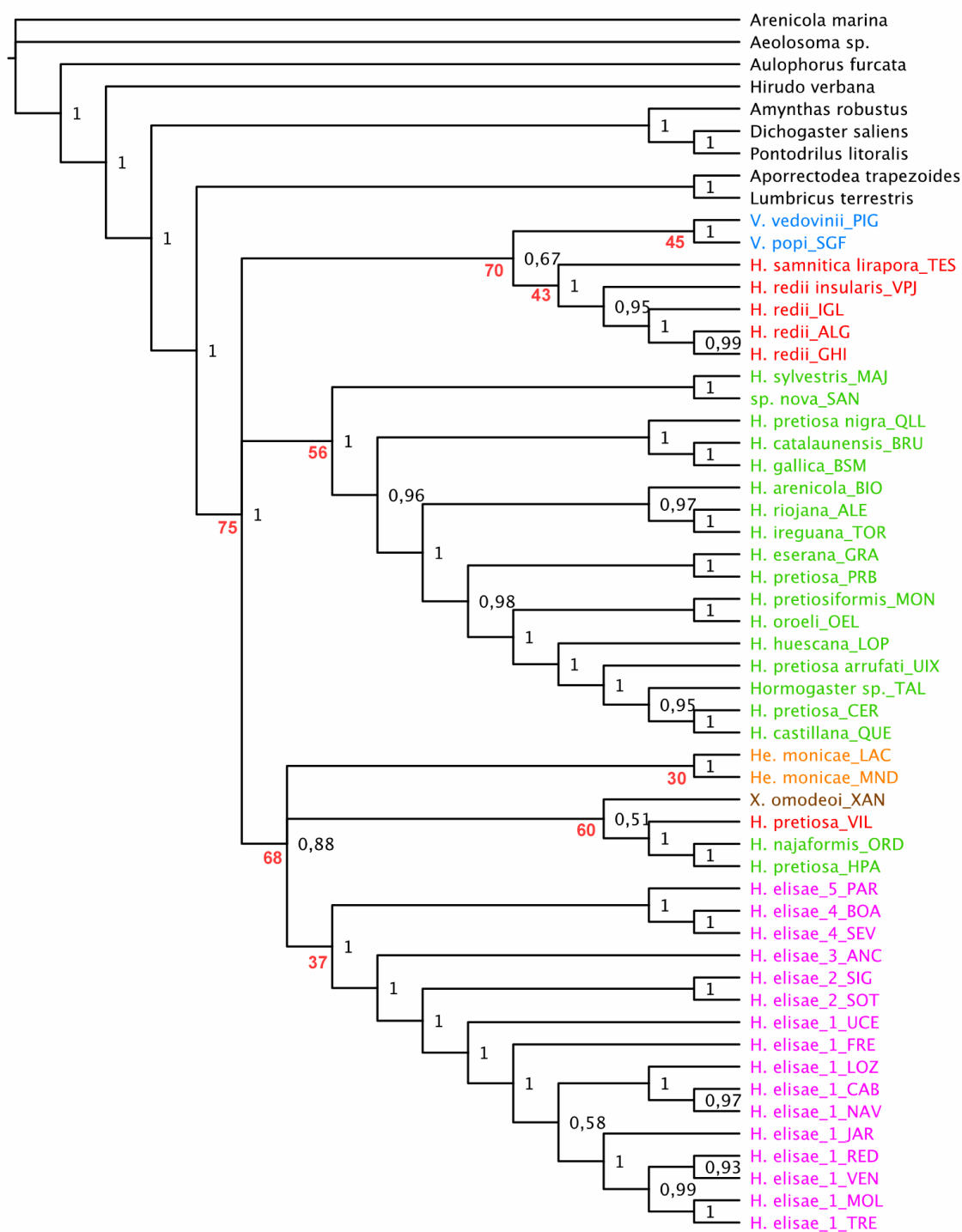
**Tabla VI.8.** Longitud de los árboles para las distintas particiones analizadas y valores de congruencia (ILD) para los análisis combinados de los seis loci con distintas combinaciones de parámetros (columna de la izquierda). El primer numeral usado en las combinaciones corresponde al ratio entre “indel”/transversión y los dos números siguientes corresponden al ratio entre transversión/transición; por ejemplo 111 corresponde a pesos iguales y 121 corresponde a un ratio “indel”/transversión de 1 y a un ratio transversión/transición de 2:1. Así, los “indels” tienen un coste de 2, las transversiones tienen un coste de 2 y las transiciones tienen el coste de 1. En el apéndice 4 de Giribet *et al.* (2002) se muestra una lista de las matrices específicas que esto implica. El valor óptimo de ILD se muestra resaltado en negrita y cursiva.

El tamaño de la secuencia concatenada utilizada para los análisis filogenéticos fue de 4.547 pares de bases. Las pruebas de máxima verosimilitud llevadas a cabo con JMODELTEST indicaron que el modelo que mejor definía la evolución de las secuencias era GTR+I+G para la secuencia concatenada y todas las particiones excepto para el gen H4, que se ajustó más a un modelo de evolución HKY+I.

El árbol generado por BI se muestra en la Figura VI.8. Este análisis generó exactamente la misma topología cuando se excluyeron las terceras posiciones de los genes COI y H3, pero algunos valores de probabilidad posterior aumentaron (no se muestran). El árbol de ML (con un valor de “log likelihood” de - 37.467,335496) se puede observar en la Figura VI.9.

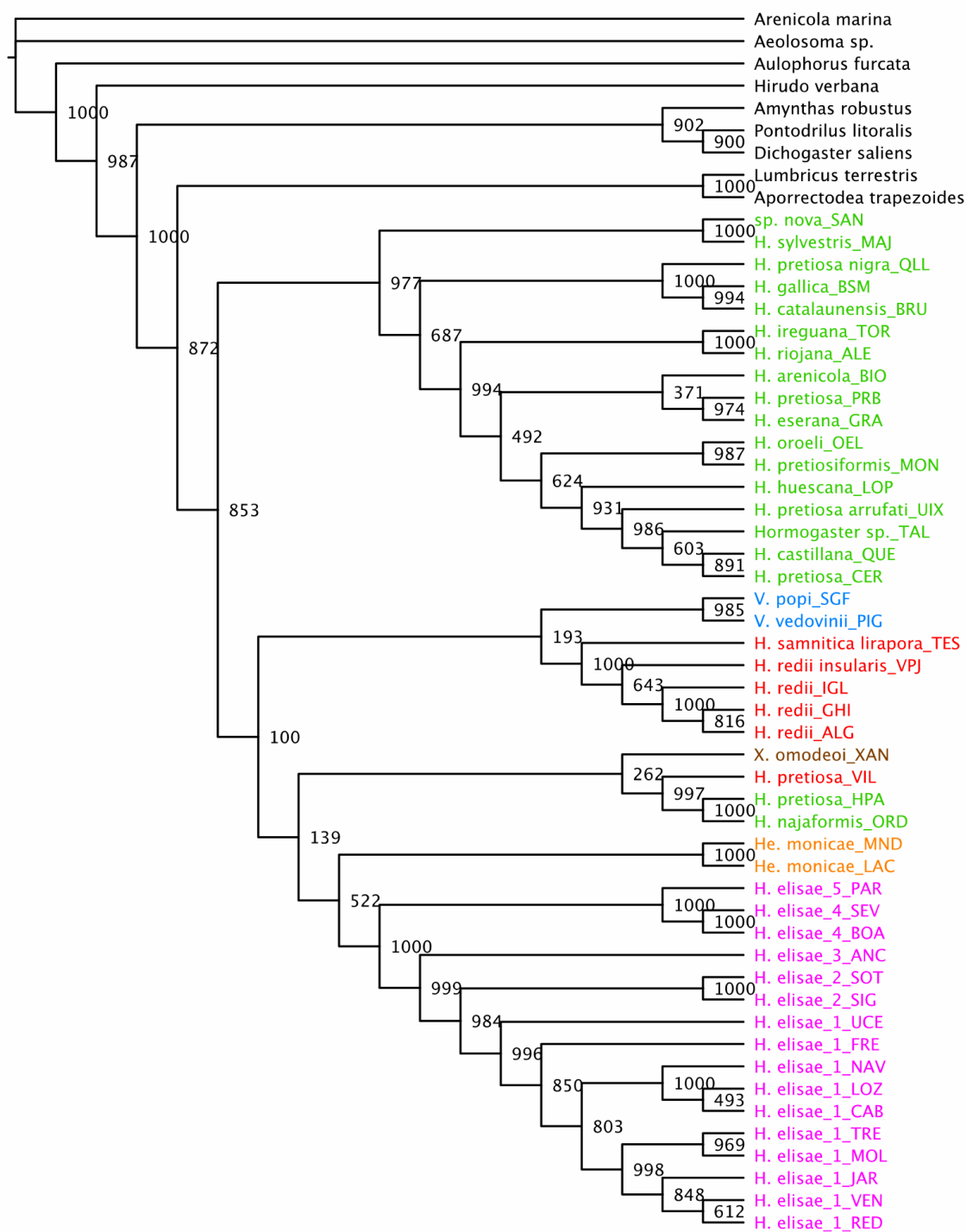


**Figura VI.7.** Árbol más parsimonioso (MP) con coste 10.933 elaborado mediante el programa POY basado en el análisis de los seis fragmentos génicos amplificados en hormogástridos. Se muestran los valores de Bootstrap (sobre 100 pseudoréplicas, indicado sobre 1) en los nodos. Bajo los nodos de los clados principales se muestra en rojo el resultado de la datación con R8S en millones de años. Los colores de las especies se corresponden a los utilizados en la Figura VI.1: *Hemigastrodrilus* en naranja, *Vignysa* en azul, *Xana* en marrón, *Hormogaster* de las islas en rojo, *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia en verde, complejo de *Hormogaster elisae* en rosa, grupos externos en negro.



**Figura VI.8.** Hipótesis filogenética reconstruida por el método de inferencia bayesiana (BI) basado en el análisis de los seis fragmentos génicos amplificados en hormogástridos. Se muestran los valores de probabilidad posterior en los nodos cuando son superiores a 0,5. Bajo los nodos de los clados principales se muestra en rojo el resultado de la datación con R8S en millones de años. Los colores de las especies se corresponden a los utilizados en la Figura VI.1: *Hemigastrodrilus* en naranja, *Vignysa* en azul, *Xana* en marrón, *Hormogaster* de las islas en rojo, *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia en verde, complejo de *Hormogaster elisae* en rosa, grupos externos en negro.

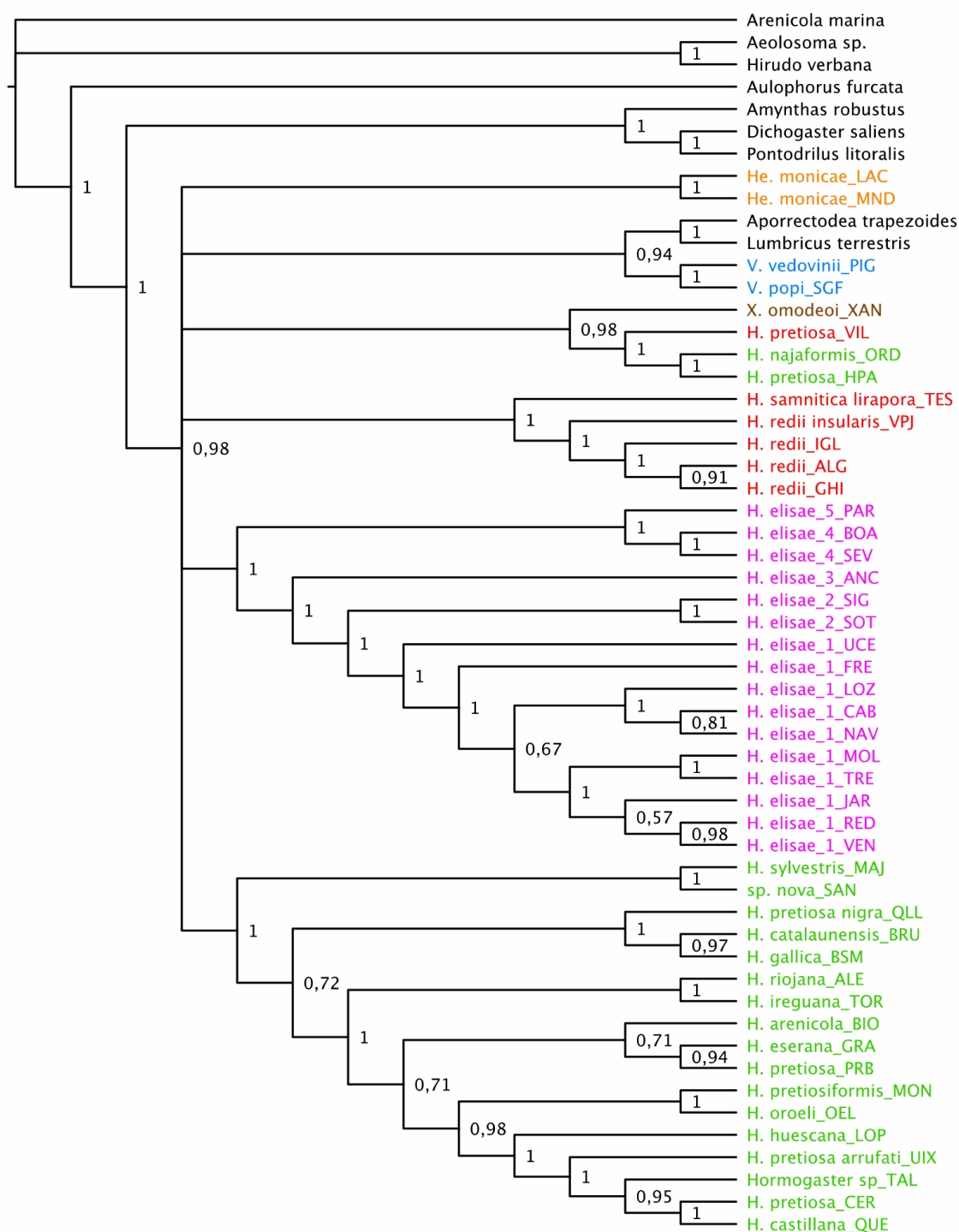




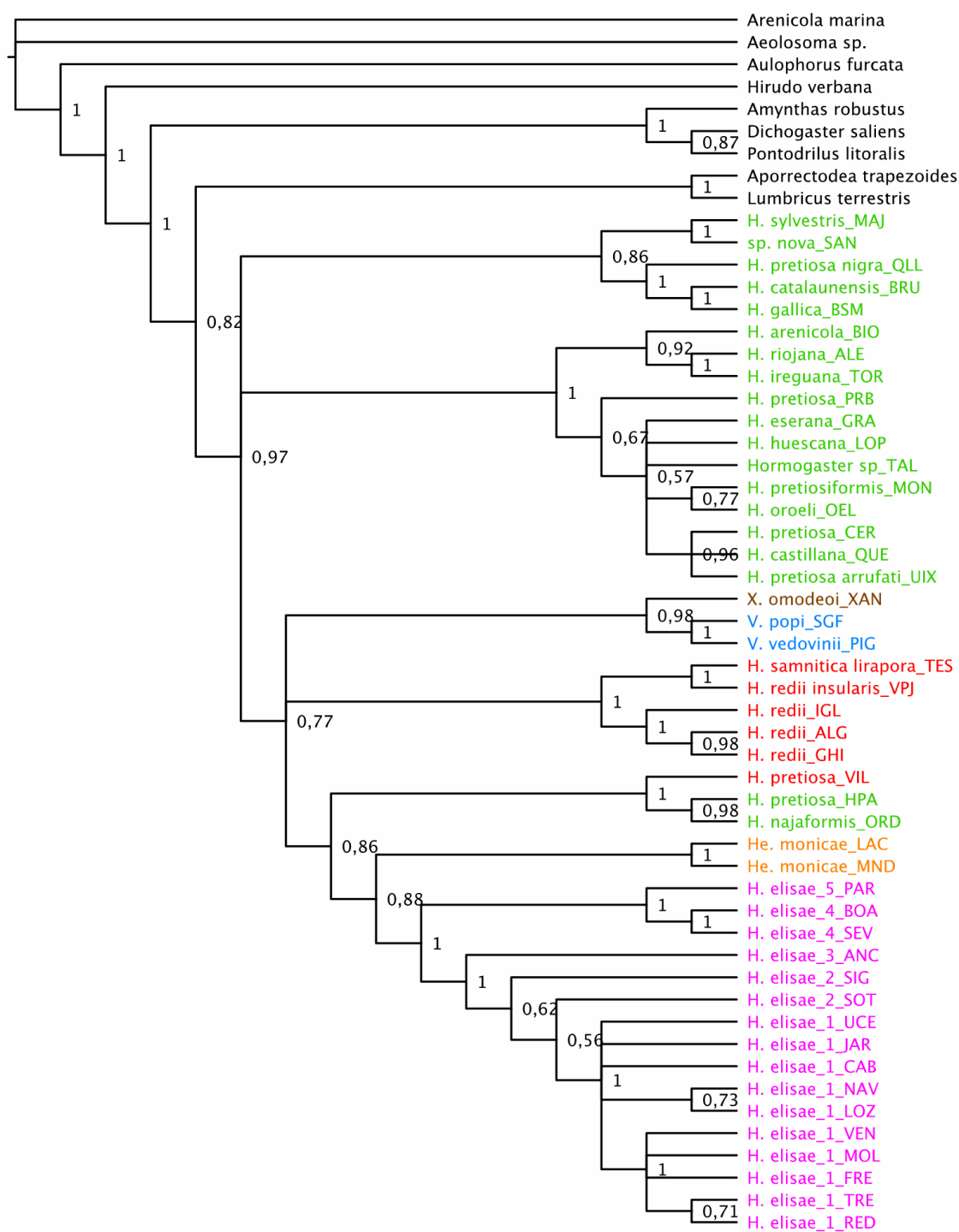
**Figura VI.9.** Árbol de Máxima verosimilitud (ML) (log likelihood: - 37.467,335496, basado en el análisis de los seis fragmentos génicos amplificados en hormogástridos. Se muestran los valores de Bootstrap (sobre 1.000 pseudoréplicas) en los nodos. Los colores de las especies se corresponden a los utilizados en la Figura VI.1: *Hemigastrodrilus* en naranja, *Vignysa* en azul, *Xana* en marrón, *Hormogaster* de las islas en rojo, *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia en verde, complejo de *Hormogaster elisae* en rosa, grupos externos en negro.

Los árboles muestran unas características comunes y algunas variaciones. El monofiletismo de la Familia Hormogastridae (que en MP tiene un soporte bajo), el polifiletismo del género *Hormogaster* y de *H. pretiosa* y la diferenciación de los mismos grandes clados son resultados constantes entre los diferentes análisis. Se observa que el complejo de especies de *H. elisae* constituye una única línea evolutiva, que generalmente aparece directamente relacionada con *Hemigastrodrilus* (MP y ML) o bien formando un clado con este género y otras especies (BI), pero en el que nunca se intercalan otras especies de *Hormogaster*. Otro clado bien diferenciado está constituido por todas las especies de *Hormogaster* que se encuentran en el nordeste peninsular y sur de Francia a excepción de dos, *H. najaformis* (ORD) y *H. pretiosa hispanica* donada por Omodeo (HPA), que forman un grupo totalmente independiente junto con la población de *H. pretiosa* en Cerdeña (VIL). Este pequeño clado aparece relacionado en todos los árboles con *X. omodeoi*, aunque con unos valores de soporte muy bajos y la relación de este conjunto con el resto de componentes de la Familia no está clara, variando entre análisis. Un último clado estaría formado por *H. redii* y *H. samnitica lirapora* procedentes de Córcega y Cerdeña, que en ocasiones aparecen relacionadas con *Vignysa* (BI y ML). Este género, teniendo en cuenta el análisis de MP se habría diferenciado antes del resto de la Familia, aunque esto está apoyado por unos valores de soporte bajos.

En las Figuras VI.10 y VI.11 se muestran los árboles elaborados con los genes de origen mitocondrial y nuclear respectivamente. Se observa que aunque en líneas generales estos árboles ofrecen una información similar a los construidos con los seis genes, recogiendo los mismos clados principales, hay diferencias entre los dos análisis, con algunos puntos a destacar. En primer lugar se observa que en el árbol elaborado con las secuencias mitocondriales, los lumbrícidos se intercalan entre los hormogástridos, y se unen a *Vignysa*, rompiendo así el monofiletismo de la Familia. En el árbol elaborado con secuencias nucleares destaca el hecho de que por primera vez *Xana* y *Vignysa* aparecen en el mismo clado y, además, con altos valores de soporte estadístico. Además, estas regiones más conservadas subdividen el clado del nordeste de la Península Ibérica en otro clado adicional.



**Figura VI.10.** Hipótesis filogenética de los hormogástridos reconstruida por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los fragmentos mitocondriales (COI, 16S-tRNA). Los valores de probabilidad posterior se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,5. Los colores de las especies se corresponden a los utilizados en la Figura VI.1: *Hemigastrodrilus* en naranja, *Vignysa* en azul, *Xana* en marrón, *Hormogaster* de las islas en rojo, *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia en verde, complejo de *Hormogaster elisae* en rosa, grupos externos en negro.



**Figura VI.11.** Hipótesis filogenética de los hormogástridos reconstruida por el método de inferencia bayesiana basado en la secuencia de los fragmentos nucleares (18S, 28S, H3, H4). Los valores de probabilidad posterior se muestran en los nodos cuando son superiores a 0,5. Los colores de las especies se corresponden a los utilizados en la Figura VI.1: *Hemigastrodrilus* en naranja, *Vignysa* en azul, *Xana* en marrón, *Hormogaster* de las islas en rojo, *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia en verde, complejo de *Hormogaster elisae* en rosa, grupos externos en negro.

**VI.3.2.c. Estima de tasas moleculares y tiempos de divergencia**

Se utilizó la separación de las microplacas mediterráneas occidentales para datar los árboles filogenéticos obtenidos y calcular la tasa de sustitución del gen mitocondrial COI. La calibración del árbol obtenido con PHYML arrojó fechas similares a las obtenidas con el árbol elaborado mediante inferencia Bayesiana (Figura VI.8) y la inclusión o no de los grupos externos no implicó variaciones. La calibración del árbol obtenido con el programa POY (Figura VI.7) mostró alguna diferencia debido a la diferente topología, pero las fechas aproximadas conciden. La diversificación de los hormogástridos pareció ocurrir hace unos 97-75 millones de años, el clado del complejo de especies de *H. elisae* parece tener una antigüedad de aproximadamente 42-37 millones de años y el origen del clado formado por las especies de *Hormogaster* del nordeste de la Península Ibérica y sur de Francia está datado en unos 56-53 millones de años.

La tasa de sustitución global (de los seis fragmentos amplificados) resultó ser 0,2784% de sustituciones por posición y millón de años con una desviación típica de 0,1599%. Para el COI, la tasa de sustitución resultó de aproximadamente 0,8175% sustituciones por posición y millón de años (que sería lo mismo que una divergencia entre taxones de 1,635%), con una desviación típica de 0,6089% indicando un máximo de 3,502% y un mínimo de 0,2919%. Debido a la gran variación encontrada, se calculó la tasa de sustitución del gen COI para algunos grandes clados, eliminando del análisis mediante el comando “prune” los taxones que no se incluían en el clado en cuestión. Esto se hizo con las constricciones de las fechas de los análisis generales obtenidas con los árboles de MRBAYES y POY para poder comparar los resultados, que se muestran en la Tabla VI.9. Los resultados no variaron según las fechas de los distintos árboles, pero arrojaron tasas muy distintas en función del clado: aproximadamente 0,6% sustituciones por posición y millón de años en el clado formado por las especies de *Hormogaster* del nordeste peninsular y sur de Francia, 0,7% en el clado en el que se incluyen los taxones separados hace 33 millones de años de Cataluña y sur de Cerdeña y 2,5-2,9% sustituciones por posición y millón de años en el clado de *H. elisae* en el centro de la Península Ibérica, aunque esta última sigue teniendo una desviación típica bastante grande.

	HorNE (56ma_MRBAYES)	HorNE (53ma_POY)	<i>H.elisae</i> (37ma_MRBAYES)	<i>H.elisae</i> (42ma_POY)	Separación (ORD y VIL) (33ma)
<b>Media</b>	0,565%	0,597%	2,887%	2,543%	0,700%
<b>d.t.</b>	0,138%	0,146%	3,855%	3,396%	1,378e-8%
<b>Mínimo</b>	0,296%	0,312%	0,314%	0,276%	0,699%
<b>Máximo</b>	0,837%	0,885%	17,65%	15,55%	0,699%
<b>Divergencia</b>	1,130%	1,194%	5,774%	5,086%	1,398%

**Tabla VI.9.** Tasas de sustitución del gen COI por posición y millón de años calculadas para distintos clados y a partir de las fechas de los árboles generales, generadas por distintos análisis. Se indica en la fila superior el clado de interés, la fecha que se incluyó como restricción y el programa que generó esa fecha para ese clado. En la última fila se indica el valor de divergencia equivalente. HorNE: *Hormogaster* del nordeste de la Península y sur de Francia, Separación: se refiere al clado formado por los especímenes de ORD (Cataluña) y VIL (Cerdeña), entre los que se supone una separación de 33 millones de años, ma: millones de años, d.t.: desviación típica.

### VI.3.3. Evaluación de factores del suelo

Las características del suelo de cada localidad se muestran en la Tabla VI.10. Para consultar esta información sobre las localidades donde se recogió *H. elisae* véase la Tabla V.4. Los resultados de los test de Mantel se pueden observar en la Tabla VI.11.

El análisis de componentes principales reveló tres factores que explicaban el 77,52% de la varianza total entre localidades en las variables del suelo estudiadas. Los coeficientes de los tres componentes se muestran en la Tabla VI.12 y la representación gráfica de las localidades en los dos primeros ejes obtenidos se presenta en la Figura VI.12.

Localidad	%Arena gruesa	%Arena fina	%Arena total	%Limo grueso	%Limo fino	%Limo total	%Arcilla	Clasificación textural	%C	%N	C/N	pH
ALE	9,24	25,12	34,36	55,38	1,86	57,24	8,40	Franco-Limosa	1,63	0,30	5,33	7,33
BSM	25,21	8,33	33,55	7,11	36,49	43,60	22,85	Franca	3,88	0,94	4,13	5,51
BIO	7,53	14,10	21,62	4,36	69,01	73,37	5,01	Franco-Limosa	3,86	1,20	3,21	7,19
BRU	47,50	12,61	60,11	5,25	17,72	22,97	16,92	Franco-Arenosa	4,76	1,32	3,61	4,76
CER	20,41	14,22	34,64	9,24	40,34	49,58	15,78	Franca	2,70	0,54	5,01	7,5
TES	69,76	12,69	82,45	2,23	7,92	10,16	7,40	Arenosa-Franca	1,21	0,37	3,31	5,78
GHI	11,32	10,15	21,47	12,49	39,85	52,34	26,19	Franco-Limosa	5,81	1,37	4,24	5,6
GRA	25,03	20,86	45,89	13,08	32,31	45,39	8,72	Franca	2,20	0,68	3,23	7,49
IGL	30,54	14,40	44,94	19,20	5,34	24,54	30,52	Franco-Arcillosa	1,83	0,51	3,56	7,26
LAC	23,67	8,26	31,92	5,45	43,64	49,09	18,99	Franca	4,44	0,93	4,79	7,44
LOP	33,99	12,37	46,36	4,50	30,10	34,60	19,05	Franca	1,59	0,37	4,36	7,79
MND	38,47	23,95	62,42	5,95	27,61	33,55	4,03	Franco-Arenosa	2,15	0,52	4,14	7,6
MON	10,21	15,17	25,38	5,61	66,64	72,25	2,37	Franco-Limosa	1,78	0,35	5,15	7,59
MAJ	11,71	6,50	18,22	6,88	69,02	75,90	5,88	Franco-Limosa	2,98	0,83	3,60	7,39
ORD	19,24	9,73	28,97	9,35	32,72	42,07	28,97	Franco-Arcillosa	3,72	0,76	4,91	7,38
OEL	12,90	28,49	41,38	12,32	21,80	34,12	24,50	Franca	2,76	0,53	5,16	7,3
PRB	15,37	15,83	31,20	6,85	59,30	66,15	2,66	Franco-Limosa	3,44	0,71	4,87	7,42
PIG	20,21	11,09	31,31	7,78	33,55	41,33	27,36	Franca	4,26	0,85	5,02	7,4
QUE	34,18	26,25	60,43	4,65	32,83	37,47	2,09	Franco-Arenosa	3,79	0,84	4,49	7,47
QLL	11,04	11,09	22,13	3,46	72,08	75,54	2,33	Franco-Limosa	1,81	0,52	3,52	7,62
SGF	16,68	23,62	40,30	13,19	28,82	42,00	17,70	Franca	2,34	0,67	3,48	7,55
XAN	9,01	5,67	14,68	1,84	22,00	23,84	61,48	Arcillosa	3,34	1,25	2,68	5,26
SAN	13,57	9,62	23,18	6,27	32,37	38,64	38,18	Franco-Arcillosa	4,48	1,32	3,39	7,09
TAL	11,28	16,33	27,61	8,81	61,27	70,08	2,31	Franco-Limosa	2,23	1,41	1,58	7,57
TOR	19,78	25,04	44,82	15,87	17,87	33,74	21,44	Franca	2,32	0,53	4,37	7,45
UIX	33,24	16,93	50,17	4,57	21,41	25,98	23,85	Franco-Arcillo-Arenosa	3,19	0,39	8,18	7,56
VPJ	30,61	17,82	48,43	7,57	34,68	42,25	9,31	Franca	2,59	0,29	8,93	5,73

**Tabla VI.10.** Propiedades del suelo en las localidades donde se muestrearon los hormogástridos incluidos en este estudio. C: carbono, N: nitrógeno. ALG y HPA no están incluidas ya que los ejemplares fueron cedidos por otros autores y no se pudieron obtener muestras de suelo. VIL no está incluida porque las muestras en esta localidad se recogieron posteriormente a la realización de los análisis de suelo. Véase el nombre de la localidad completo en la Tabla VI.1.

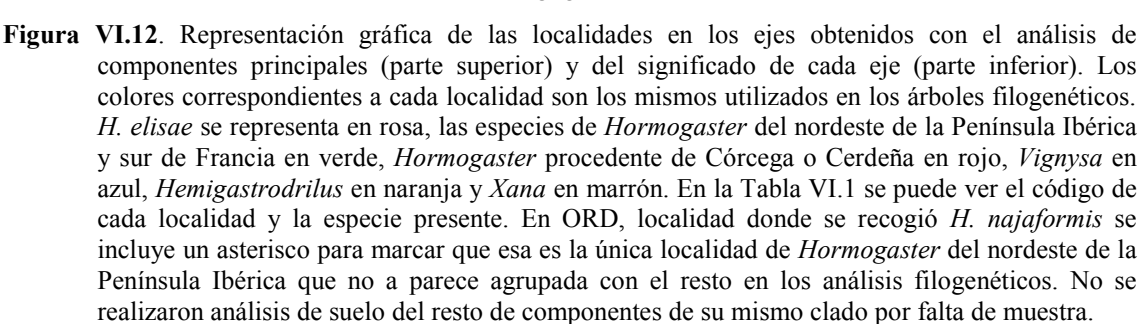
	COI		16S-tRNA		H3		H4	
	p	r	p	r	p	r	p	r
<b>Arena gruesa</b>	<b>0,023</b>	<b>0,125</b>	0,120	0,070	<b>0,004</b>	<b>0,146</b>	<b>0,001</b>	<b>0,173</b>
<b>Arena Fina</b>	0,630	-0,023	0,350	0,030	0,199	0,050	0,060	0,080
<b>Arena Total</b>	0,076	0,086	<b>0,038</b>	<b>0,087</b>	<b>0,001</b>	<b>0,157</b>	<b>0,003</b>	<b>0,135</b>
<b>Limo Grueso</b>	<b>0,003</b>	<b>0,158</b>	<b>0,009</b>	<b>0,130</b>	0,313	0,056	0,119	0,085
<b>Limo Fino</b>	<b>0,014</b>	<b>0,155</b>	<b>0,031</b>	<b>0,121</b>	<b>0,000</b>	<b>0,194</b>	<b>0,010</b>	<b>0,135</b>
<b>Limo Total</b>	<b>0,011</b>	<b>0,158</b>	0,080	0,094	<b>0,001</b>	<b>0,173</b>	<b>0,046</b>	<b>0,090</b>
<b>Arcilla</b>	<b>0,052</b>	<b>0,127</b>	<b>0,011</b>	<b>0,133</b>	<b>0,004</b>	<b>0,150</b>	0,311	0,039
<b>C</b>	0,118	0,108	<b>0,023</b>	<b>0,130</b>	<b>0,000</b>	<b>0,227</b>	<b>0,009</b>	<b>0,136</b>
<b>N</b>	<b>0,040</b>	<b>0,143</b>	<b>0,034</b>	<b>0,123</b>	<b>0,004</b>	<b>0,175</b>	0,097	0,074
<b>C/N</b>	0,055	0,141	0,260	0,065	<b>0,024</b>	<b>0,133</b>	0,673	-0,031
<b>pH</b>	<b>0,034</b>	<b>0,119</b>	<b>0,022</b>	<b>0,112</b>	0,117	0,066	<b>0,003</b>	<b>0,147</b>

**Tabla VI.11.** Resultados del test de Mantel realizado con los valores de  $\Phi_{ST}$  entre localidades calculado con distintos genes y la diferencia (en valor absoluto) en los factores del suelo entre dichas localidades. Los valores de significación (p) que resultaron significativos (<0,05) se muestran resaltados en negrita y cursiva, así como los coeficientes de correlación (r) correspondientes. C: carbono, N: nitrógeno.

Variables	Factor 1	Factor 2	Factor 3
<b>%Arena Gruesa</b>	<b>-0,580</b>	<b>-0,666</b>	<b>0,373</b>
<b>%Arena Fina</b>	<b>-0,423</b>	0,196	<b>-0,643</b>
<b>%Limo Grueso</b>	0,032	-0,031	<b>-0,886</b>
<b>%Limo Fino</b>	0,277	<b>0,881</b>	<b>0,303</b>
<b>%Arcilla</b>	<b>0,688</b>	<b>-0,477</b>	-0,108
<b>%C</b>	<b>0,843</b>	0,200	0,155
<b>%N</b>	<b>0,837</b>	0,256	0,201
<b>pH</b>	-0,068	<b>0,721</b>	<b>-0,321</b>
<b>Varianza explicada (%)</b>	36,348	25,024	16,147

**Tabla VI.12.** Coeficientes de correlación de las variables del suelo y los factores del análisis de componentes principales. Los coeficientes en negrita y cursiva son significativos ( $P < 0,05$ ). C: carbono, N: nitrógeno.





## VI.4. Discusión

### VI.4.1. Consideraciones generales

Los árboles flogenéticos muestran el monofiletismo de la Familia Hormogastridae, que está bien soportado en el caso de los análisis probabilísticos pero presenta menores valores de Bootstrap en el caso de los árboles de parsimonia elaborados a través de la optimización directa. Esto podría explicarse, como se comentará de nuevo más adelante por la gran variabilidad que presentan los genes mitocondriales utilizados, que por sí solos (véase Figura VI.10) incluyen a los lumbrícidos dentro del grupo, relacionándolos con *Vignysa*. Algo parecido ocurría en el trabajo de Briones *et al.* (2009) en el que llegan a la conclusión de que los genes 16S y COI tienen un valor discriminatorio limitado por encima del nivel de género. Sin embargo, en este estudio, en el que se han incluido fragmentos génicos de un amplio rango de variación (véase Tabla VI.5), se podría afirmar, que los hormogástridos son monofiléticos. En cualquier caso sería interesante realizar un análisis incluyendo representantes de más familias de lombrices de tierra, ya que en un estudio realizado por Jamieson (1988) y basado en datos morfológicos, los hormogástridos resultaban ser polifiléticos. En este estudio, *Vignysa* aparecía más relacionada con los lumbrícidos y *Hemigastrodrilus* y *Hormogaster* más relacionados con microquétidos o glososcolécidos.

La situación geológica del momento en el que la Familia comenzó su diversificación, datada en este estudio en hace unos 97-75 millones de años, explica el por qué de su distribución. Esta fecha concuerda aproximadamente con la que postulaba Bouché (1972), que proponía un origen de las familias de Lumbricoidea en el Cretácico tardío y comienzo de la era Terciaria y sugería que la distribución actual de los distintos géneros de Hormogastridae es causa, probablemente, de fenómenos terciarios. Omodeo y Rota (2008) sin embargo, proponían la necesidad de 180 millones de años para la diferenciación de un nuevo género de lombrices de tierra. Esta fecha estaba basada en estimas del tiempo de divergencia entre especies congénicas a ambos lados del Atlántico (Omodeo 2000), pero no es aplicable a nuestro caso de estudio (véase más adelante el problema con las tasas de sustitución). En el Cretácico tardío, la Península

Ibérica estaba dividida en dos partes, zona este y zona oeste, separadas por agua (Andeweg 2002). Así se podría explicar el por qué no se encuentran hormogástridos en la zona más occidental de la Península. Asimismo, un brazo de mar entraba en la zona en la que actualmente se encuentra la cordillera Bética, que se cerró cuando se produjo el surgimiento de esta cordillera (que comenzó hace aproximadamente 11 millones de años, Andeweg 2002), lo que podría explicar la falta de hormogástridos al sur de Castellón, actuando tanto la zona anegada, como las montañas de barrera geográfica para la dispersión de estos animales. Aun así, la situación de *Xana* relativa a la distribución general de los hormogástridos llama la atención. ¿Qué significado tiene la presencia aislada de este género en Asturias? La primera hipótesis que se podría plantear es que *Xana* fuera una introducción de individuos procedentes de alguna de las poblaciones de *Vignysa*, ya que este género es el más parecido por poseer también dos mollejas anteriores. Sin embargo, según los resultados obtenidos en este trabajo, se puede descartar la posibilidad de una introducción, al menos humana, ya que *Xana* y *Vignysa* presentan altas divergencias genéticas (de 21% en el COI y 15% en el 16S) y se encuentran en diferentes clados en los árboles filogenéticos, excepto en el árbol elaborado con los genes nucleares, más conservados (véase más adelante), lo que justifica la separación como géneros diferentes. En segundo lugar, se podría pensar que *Xana* colonizó el lugar donde está actualmente mediante dispersión a través de la unión de tierra que se produjo en el norte entre las zonas este y oeste de la Península hace aproximadamente 36 millones de años (Andeweg, 2002). Pero en cualquier caso, la distribución de *Xana* sigue siendo algo muy aislado, ya que León, Zamora y Salamanca están razonablemente bien muestreados y nunca se han capturado hormogástridos (Briones 1991). De la misma forma, aunque el muestreo realizado fue menos intensivo, tampoco se han encontrado hormogástridos en Cantabria, ni en el País Vasco, no apareciendo hasta Navarra. A modo de hipótesis es posible que pueda haberse producido una extinción en masa por esas zonas debido a la competencia con otras especies de lombrices de tierra en suelos más ricos y más arcillosos, donde los hormogástridos no presentan tanta ventaja, siendo la localidad de San Román uno de los pocos remanentes.

Una de las cosas que dejan claras los análisis filogenéticos del presente estudio es que el género *Hormogaster* es polifilético y su relación con el resto de los géneros no está bien resuelta. Probablemente sea necesario un muestreo más intensivo, al menos de

las poblaciones de *Vignysa* y *Hemigastrodrilus* (no se conocen más poblaciones de *Xana*), para desentrañar estas relaciones. Parece además que en los análisis podrían faltar formas intermedias que no se han encontrado. El hecho de que la Familia sea tan antigua, dificulta conseguir las formas intermedias ya que aumenta la probabilidad de que se hayan producido extinciones. A esto se le suma además la posibilidad de que existan muchas especies de hormogástridos todavía sin describir, debido a la falta de muestreo de ciertas áreas donde la Familia se distribuye potencialmente. En este trabajo, los muestreos se han focalizado en las localidades donde se habían descrito previamente las especies, y todavía existen zonas amplias de Guadalajara, Soria, Teruel, Zaragoza y otras sin muestrear lombrices de tierra. De hecho, en Sant Joan de les Abadesses (Gerona), se esperaba encontrar la especie *H. gallica* citada por Qiu y Bouché (1998) en esta localidad y, sin embargo, se encontró una especie nueva. Asimismo en Talarn (Lérida) no hemos podido asignar los ejemplares a la especie *H. lleidana*, que describieron Qiu y Bouché (1998) en esta localidad. Todo esto indica que se debe realizar un mayor esfuerzo de muestreo para encontrar toda la diversidad que representa esta Familia de lombrices de tierra.

Este esfuerzo de muestreo sí que ha sido realizado en la zona centro de la Península Ibérica, donde parece que ha habido una colonización única o un enclave donde ha persistido una estirpe aislada (véase capítulo V). En esta zona, a pesar del gran esfuerzo de muestreo, se ha encontrado siempre la forma morfológica *H. elisae*, contrariamente a lo que ocurre en Huesca, Lérida, Barcelona, Gerona o Castellón, provincias donde hay varias especies coexistiendo. En este capítulo se confirma el hecho de que *H. elisae* constituye un linaje evolutivo totalmente independiente al resto de las especies del género *Hormogaster*, lo que indica que no tiene ninguna relación evolutiva directa con este género y, por ello, podría ser considerado como un nuevo género (véase capítulo VII). Además, este linaje se observa relacionado con *Hemigastrodrilus*, por lo que se podría especular un origen de *H. elisae* a partir de este género. El punto común de ambos, es que aparecen en la vertiente Atlántica. Todo esto tiene implicaciones muy importantes para la taxonomía de esta Familia, que debe ser reestructurada (véase capítulo VII).

Otra conclusión que se puede sacar de este estudio es que parece que las especies de hormogástridos presentes en Córcega y Cerdeña han recibido dos

influencias genéticas muy diferentes. En estas islas hay una línea genética que probablemente está más relacionada con *Vignysa* e incluye a *H. redii* y *H. samnitica lirapora*. Probablemente dentro de esta primera línea se escondan más especies crípticas, ya que las divergencias genéticas encontradas entre las poblaciones de *H. redii* son muy grandes. Los rangos de divergencia entre las poblaciones de esta especie varían desde 12,64% entre ALG y GHI y 16,56% entre ALG e IGL en el COI y 5,73% entre ALG y GHI y 8,47% entre GHI e IGL en el 16S-tRNA, sin contar los valores de VPJ donde está descrita la subespecie *H. redii insularis*, que proponemos elevar al rango de especie (véase capítulo VII). Hay que tener en cuenta que Córcega y Cerdeña están entre las regiones de mayor nivel de endemismo en la cuenca Mediterránea (Medail y Quezel 1999). Parece que los procesos de especiación críptica son comunes dentro de esta Familia, pero la identificación de los linajes crípticos dentro de esta morfoespecie está fuera de los objetivos de este trabajo y tendrá que ser explorado con mayor intensidad en un futuro. Por otro lado, la segunda línea genética de las presentes en el sistema Corso-Sardo, sólo ha colonizado el suroeste de Cerdeña, donde se encuentra *H. pretiosa* en el área de su descripción original. Ésta se relaciona más con algunas especies de *Hormogaster* del nordeste peninsular. La zona suroccidental de Cerdeña, que es donde se encuentra esta especie, ha sido propuesta como una región biogeográfica separada, con base en estudios de endemismo de especies de plantas y en características geolitológicas, geomorfológicas, paleogeográficas, bioclimáticas y de vegetación únicas (Bacchetta *et al.* 2007). Además, parece que durante mucho tiempo la esquina suroccidental de Cerdeña estuvo separada del grueso de la isla por un brazo de mar, que se rellenaría posteriormente con depósitos aluviales de la llanura de Campidano (Omodeo y Rota 2008). El hecho de que en estas islas existan dos influencias genéticas diferentes tiene sentido en cuanto a la situación de las placas mediterráneas occidentales, ya que la zona norte de las islas siempre ha estado más en contacto con el sur de Francia y la zona sur con el nordeste peninsular (Andeweg 2002). Según Omodeo y Rota (2008), la fauna autóctona del sistema Corso-Sardo se origina con certeza a partir de Cataluña y en menor medida de Provenza, y concretamente dicen que es probable que la mayoría de las especies que se encuentran en Cerdeña tengan un origen en los Pirineos, mientras que la mayor parte de las especies de Córcega se originaron en Provenza o los territorios del oeste de los Alpes, lo que concuerda con estas dos influencias genéticas que hemos encontrado en este estudio.

Las especies de *Hormogaster* del nordeste de la Península Ibérica, igual que ocurre con las de las islas, se encuentran divididas en dos clados, y en ambos se incluyen individuos identificados como *H. pretiosa* y subespecies. El polifiletismo de esta especie implica la necesidad de una redescrición de la misma (véase capítulo VII). *H. pretiosa* fue originalmente descrita en Cerdeña, y por lo tanto, el resto debería recibir un nombre diferente. Cobolli Sbordonì *et al.* (1992) encontraron distancias genéticas elevadas entre *H. pretiosa* peninsular e insular, pero como no incluyeron en el análisis a todas las especies descritas (y muchas se describieron después) no detectaron su polifiletismo. De hecho, estos autores ya indicaron que cualquier propuesta para la revisión de la nomenclatura de *H. pretiosa* estaría justificada solamente tras el examen de más material de Cataluña. Ahora, tenemos los ejemplares y la información suficiente para asegurar que no se trata de la misma especie. Omodeo y Rota (2008) indican que Cobolli Sbordonì *et al.* (1992) ya habían propuesto asignar a las poblaciones catalanas el nombre de *Hormogaster hispanica*, sin ser esto totalmente cierto. Lo que simplemente plasman estos autores en su artículo, es que los altos valores de divergencia encontrados entre las poblaciones de *H. pretiosa* sugieren la división de esta morfoespecie en tres especies hermanas, sin asignarles en ningún caso el nombre. Posteriormente, Rota (1993) sí describe una especie nueva: *H. gallica*, pero no *H. hispanica*.

La hipótesis filogenética que representa el árbol generado por POY y basado en parsimonia, a pesar de presentar valores de Bootstrap muy inferiores a lo esperado para un buen soporte, es quizás la más creíble desde el punto de vista biogeográfico. Si se tiene en cuenta esta hipótesis, se podría decir que *Vignysa* es el grupo hermano de los restantes miembros de la Familia, lo cual podría indicar un estado más ancestral de este género. Según este árbol, después se diferenciarían una línea genética presente en el norte de las islas y otra línea que daría lugar por una parte, al linaje Atlántico con *Hemigastrodrilus* y el complejo de *H. elisae* y por otra parte, al linaje del nordeste de la Península, del que se separaría más adelante otro subclado, donde se encuentran *H. najafornis* (ORD), *H. pretiosa hispanica* cedida por Omodeo (HPA) y *H. pretiosa* de Cerdeña (VIL). Todo esto estaría más o menos justificado desde el punto de vista biogeográfico, aunque llama la atención la posición de *Xana*, que se une a esta última línea. Desde el punto de vista morfológico, el hecho de que *Vignysa* fuera el primer género en diferenciarse sería plausible debido a que posee dos mollejas, mientras que el

resto de los homogástridos (excepto *Xana*) presentan tres. Así, podríamos pensar que de un estado de una molleja en lumbrícidos, se ha pasado a un estado de dos mollejas en *Vignysa* y un estado de tres mollejas en el resto de hormogástridos. Sin embargo, *Xana* vuelve a romper los esquemas desde este punto de vista morfológico y su posición en los árboles implicaría eventos múltiples de generación de la tercera molleja o una regresión hacia el carácter de dos mollejas. *Xana* de hecho, vive en unos suelos muy distintos, como se puede observar en el análisis de componentes principales (véase más adelante). El suelo donde se encuentra este género, es más arcilloso que el del resto de hormogástridos, por lo que quizás se podría explicar una regresión del carácter debido a la ausencia de necesidad de una trituración tan exhaustiva como lo sería en un suelo más arenoso. Sería posible por tanto que la presión selectiva hubiera descartado la tercera molleja. En cualquier caso se ha observado que *Xana* y *Vignysa* se presentan juntas cuando se elabora el árbol con los genes nucleares, más conservados. Podrían, por tanto, estar los genes mitocondriales nublando las relaciones entre estos géneros debido a la alta variabilidad que presentan.

Se observa que los genes mitocondriales son genes mucho más variables y que no resuelven la filogenia de la Familia adecuadamente, ya que sólo dan información en las separaciones más modernas. Si se observan los valores de divergencia con estos genes, se detectan valores similares entre las diferentes especies de hormogástridos y de estos con *Aporrectodea trapezoides*, un lumbrícido. Y de hecho en el árbol generado por estos genes, los lumbrícidos aparecen agrupados con *Vignysa*. Algo parecido pasaba con la filogenia elaborada por Briones *et al.* (2009) que, como se comenta al comienzo de la discusión, indicaban que los genes 16S y COI tienen un valor discriminatorio limitado por encima del nivel de género. Así, se justifica la inclusión de los genes nucleares de evolución más lenta, para trabajar a estos niveles. El hecho de que los valores de divergencia genética entre hormogástridos y de estos con *A. trapezoides* sean del mismo orden en algunas ocasiones, da idea también del grado de variabilidad genética que ha alcanzado esta Familia de lombrices de tierra.

Los genes nucleares parecen definir mejor las relaciones más antiguas y como se ha comentado, por primera vez *Xana* y *Vignysa* aparecen juntos en ese árbol, lo que sería más plausible desde el punto de vista taxonómico. Con los genes nucleares también se define otro grupo dentro del nordeste peninsular y sur de Francia, que

incluye a las especies más norteñas. Esta división podría explicarse por la separación que existía entre las áreas francesas y españolas donde se encontraban los hormogástridos, marcada por la cuenca del Ebro (Omodeo y Rota 2008). Esto se puede observar en la Figura I.7 donde se representa un mapa paleogeográfico del Mediterráneo occidental en el Eoceno tardío.

Muchos de los caracteres morfológicos se distribuyen de forma aleatoria en el árbol, generando bastante entropía a la hora de interpretar los resultados. El primer ejemplo claro es el del número de mollejas como ya se ha discutido, pero hay otros caracteres como las espermatecas, que son tubulares en la línea genética de *H. elisae* y también en *V. popi* (aunque menos alargadas), dispuestas en dos filas en *H. najaformis* y *H. samnitica lirapora*, o con varios eyaculados en su interior en algunas especies del clado de *Hormogaster* del nordeste la Península Ibérica y *V. vedovinii*.

#### VI.4.2. El problema de las tasas de sustitución

Se ha visto que las tasas de sustitución son muy variables incluso dentro de una misma Familia, ya que hemos obtenido valores desde 0,6% a 2,9% sustituciones por posición y millón de años para el COI, en función del clado con el que estuviéramos trabajando. Estas tasas implican una divergencia de 1,2% a 5,8% por millón de años dependiendo de la rapidez de mutación de cada linaje analizado, rango en el que se incluye el valor de 3,5%, utilizado para los análisis demográficos en el capítulo IV y calculado en megascolécidos por Chang y Chen (2005). Sin embargo, queda demostrado que no se puede hablar de una tasa general para lombrices de tierra, y las estimas de tiempo de expansión del capítulo IV deben ser recalculadas a la luz de estas nuevas tasas, más específicas (véase Anexo XI) La afirmación por tanto de Omodeo (2000), que indica la necesidad de 180 millones de años para la diferenciación de un nuevo género en lombrices de tierra, quedaría limitada a las especies estudiadas por este autor y a ese escenario concreto, por lo que no entra en contradicción con que los hormogástridos comenzaran su diversificación hace 97-75 millones de años.

Nuestros datos indican que el linaje del complejo de *H. elisae* está sufriendo una diversificación mucho más rápida, ya que la tasa de sustitución del COI en este clado es mucho mayor (2,9% sustituciones por posición y millón de años o 5,8% de divergencia



por millón de años) comparada con aquella que presentan el resto de especies de *Hormogaster* (0,6% sustituciones por posición y millón de años o 1,2% de divergencia por millón de años). Esto podría justificar, la presencia de especiación críptica dentro de este linaje en el centro de la Península Ibérica, donde hay un desajuste entre la evolución morfológica y molecular, como se comentaba en el capítulo V. Es posible que además de la uniformidad del medio, la evolución molecular sea demasiado rápida en este linaje para que se puedan reflejar los cambios morfológicos asociados. La causa de esta aceleración de la tasa está aún por descubrir.

#### VI.4.3. Relación con los factores ambientales

Se ha encontrado una ligera relación entre las distancias genéticas y los factores ambientales, pero los coeficientes de correlación del test de Mantel no son lo suficientemente altos como para sacar demasiadas conclusiones. Todos los factores, excepto el porcentaje de arena fina, presentan correlaciones significativas con alguno de los fragmentos génicos analizados. Esto indica, en comparación con los resultados del capítulo V, en el que esta correlación sólo se encontraba con dos de los factores medidos, que la variabilidad de suelos analizados es mucho mayor y que mientras en el complejo de *H. elisae*, el factor más importante era la textura del suelo, a la hora de analizar las diferentes especies de la Familia entran en juego otros factores.

Gracias al análisis de componentes principales se puede sacar alguna conclusión más. Se observa que por lo general, los hormogástridos se concentran en suelos pobres, con poca materia orgánica y bajo contenido en nitrógeno. *H. elisae* tiene una tendencia hacia las zonas con mayor contenido en arena gruesa, más ácidas y un poco más pobres, mientras que los *Hormogaster* de la zona del nordeste de la Península se encuentran en zonas de textura más fina y mayor pH. Esta observación conduce a preguntar el significado del número de láminas en el tiflosol, ya que *H. elisae*, que está en estos suelos tan arenosos y pobres presenta menos láminas (cinco) en comparación con el resto de especies de *Hormogaster*. Si estas láminas estuvieran destinadas, como se ha pensado, al aumento de superficie para aumentar la absorción, favoreciendo así la alimentación en zonas con poco contenido en materia orgánica, ¿por qué *H. elisae* presenta menos láminas que las demás?. Esta pregunta queda abierta y sería interesante investigar sobre ello en un futuro.

En el análisis de componentes principales, es destacable también el lugar que ocupa *Xana* que, al igual que en los análisis filogenéticos, rompe los esquemas. *Xana* se encuentra en suelos más arcillosos, en los que no se suelen encontrar especies de esta Familia de lombrices de tierra. Esto podría estar relacionado, como se ha comentado anteriormente, con el hecho de que esta especie presente sólo dos mollejas anteriores.

El suelo de Córcega y Cerdeña, parece tener gran heterogeneidad, ya que las muestras de estas islas se encuentran entremezcladas en el análisis de componentes principales sin mostrar una tendencia clara. Esta heterogeneidad está justificada por la historia geológica de estas islas, como se ha comentado anteriormente en esta discusión.



**VII. Algunas propuestas para una nueva taxonomía de la**  
**Familia Hormogastridae a la luz de su filogenia y morfología**



## VII. Algunas propuestas para una nueva taxonomía de la Familia Hormogastridae a la luz de su filogenia y morfología

### RESUMEN

Los análisis filogenéticos de Hormogastridae realizados en el capítulo VI han arrojado resultados contradictorios con la ordenación taxonómica de esta Familia existente hasta el momento. A la luz de dichos resultados y complementando éstos con la información morfológica disponible y las observaciones en el material recogido, se proponen algunos cambios en la taxonomía de Hormogastridae. Entre ellos se propone la creación de un nuevo género, *Gatodrilus*, para el linaje de la que hasta ahora se ha denominado *Hormogaster elisae*, se aumentan a rango de especie a *Hormogaster redii insularis* (*H. insularis*) y *Hormogaster pretiosa nigra* (*H. nigra*), se degrada a rango de subespecie *Hormogaster oroeli* (*H. pretiosiformis oroeli*) y se limita el nombre de *Hormogaster pretiosa* al sur de Cerdeña, donde esta especie fue descrita inicialmente.

### ABSTRACT

The results obtained in the phylogenetic analyses for Hormogastridae, executed in the chapter VI, showed contradictions with the current taxonomic classification of this Family. After these results and by adding the available morphological information and our observations of the collected material, some changes in Hormogastridae taxonomy are suggested. A new genus is proposed for the *Hormogaster elisae* lineage, which will be named *Gatodrilus*. *Hormogaster redii insularis* and *Hormogaster pretiosa nigra* are suggested to be raised to the species status (*H. insularis* and *H. nigra* respectively) and *Hormogaster oroeli* is proposed to be maintained as a subspecies as it was initially described (*H. pretiosiformis oroeli*). Finally, the name *Hormogaster pretiosa* is limited to the South of Sardinia, where it was originally described.

## VII.1. Introducción

Los árboles filogenéticos obtenidos en el capítulo VI de esta memoria con los diferentes análisis muestran algunas variaciones importantes, sobre todo en la ordenación de los grandes clados, y o bien generan algunas politomías en nodos cruciales, como sucede con el árbol generado por inferencia bayesiana (BI, Figura VI.8), o algunos de los soportes obtenidos son bajos como ocurre en los árboles elaborados por los programas POY o PHYML [Figuras VI.7 (MP) y VI.9 (ML)]. Esto obliga a que algunos de los resultados obtenidos tengan que interpretarse con mucha cautela. Sin embargo hay otros resultados que son robustos y consistentes entre los diferentes análisis, y que permiten extraer conclusiones importantes para la mejor comprensión de esta Familia.

A continuación se presentan algunas propuestas relativas a la taxonomía de la Familia Hormogastridae derivadas de las diferentes aproximaciones planteadas en esta memoria, a saber el estudio morfológico detallado de los ejemplares capturados (Tabla VI.5) y los datos moleculares, básicamente en sus dos vertientes de ordenaciones filogenéticas (Figuras VI.7- VI.11) y divergencias genéticas (Anexos VII-X). Con estas tres fuentes de datos se intentarán resolver algunos de los problemas existentes, y se plantearán otros nuevos, originados sobre todo por las incongruencias entre las ordenaciones morfológicas clásicas y los resultados derivados de los datos moleculares.

## VII.2. El sistema de géneros en los hormogástridos

Hasta este momento la Familia Hormogastridae Michaelsen, 1900 comprendía cuatro géneros: *Hormogaster* Rosa, 1887 y *Hemigastrodrilus* Bouché, 1970 en la Subfamilia Hormogastrinae, *Vignysa* Bouché, 1970 en la Subfamilia Vignysinae y *Xana* Díaz Cosín *et al.* 1989 en los Xaninae.

Los resultados obtenidos en esta memoria muestran que el género *Hormogaster* parece ser claramente polifilético, y su estudio lo abordaremos en un apartado posterior.

### VII.2.1. *Vignysa*

Las dos especies de *Vignysa*, *V. popi* Bouché, 1970 y *V. vedovinii* Rota, 1993 aparecen siempre agrupadas en todos los árboles filogenéticos y nunca se mezclan con especies de otros géneros en un mismo clado. Por otra parte *Vignysa* parece bien caracterizada morfológicamente por la presencia de dos mollejas, lo que comparte con *Xana*, en lugar de tres que es la condición presente en *Hormogaster* y *Hemigastrodrilus*.

Bouché (1970, 1972) caracteriza la Subfamilia Vignysinae por la presencia de dos mollejas y de vesículas sanguíneas subparietales, y a *Vignysa* por la presencia de una posmolleja, pero Rota (1993) describe *V. vedovinii* y señala que en esta especie no aparecen las citadas vesículas sanguíneas, que deben ser un carácter exclusivo de *V. popi*. Como se ha comentado, *V. popi* y *V. vedovinii* aparecen en el mismo clado en todos los análisis filogenéticos, lo que parece demostrar que Rota (1993) tenía razón al afirmar que las vesículas sanguíneas subparietales no son un carácter del género, sino un carácter exclusivo de *V. popi*.

Las divergencias genéticas entre *V. popi* y *V. vedovinii* son muy altas, más que suficientes para mantenerlas como especies diferentes 24,21% con el COI, 12,37% con el 16S, 1,54% con el H3 y 3,29% con el H4. Morfológicamente son fáciles de separar no sólo por las vesículas sanguíneas subparietales, sino por las quetas, espermatecas, clítelos y otros caracteres, por lo que se propone conservarlas como especies separadas. Las divergencias muy altas con algunos genes podrían incluso llevar a proponer su separación como géneros diferentes, pero en este momento parece más adecuado actuar con prudencia y no erigir más taxones nuevos a este nivel que no estén respaldados también por diferencias morfológicas. Como veremos a continuación esto plantea problemas con otro género, el género *Xana*.

### VII.2.2. *Xana*

El género *Xana* fue creado por Díaz Cosín *et al.* (1989), cuando sólo se conocía *V. popi* y se caracterizaba la Subfamilia Vignysinae por la presencia de dos mollejas y de vesículas sanguíneas subparietales.



La única especie conocida, *Xana omodeoi*, se ha capturado hasta el momento exclusivamente en la localidad de San Román (Asturias) y se caracteriza por la ausencia de vesículas sanguíneas subparietales, la presencia de glándulas de Morren rudimentarias y algunos detalles en la posición de clíelo, tubérculos y pauta de papilas.

Díaz Cosín *et al.* (1989) crearon la Subfamilia Xaninae, basándose en que *V. popi* (única especie de la Subfamilia Vignysinae conocida entonces) presentaba vesículas sanguíneas subparietales. La descripción posterior de *V. vedovinii* modifica el panorama de este conjunto de formas, ya que los Vignysinae dejan de estar caracterizados por las vesículas sanguíneas y pasan a estarlo casi exclusivamente por la presencia de dos mollejas, carácter que comparten con *Xana*. Por tanto el estatus taxonómico de estas Subfamilias queda pendiente de confirmar en el futuro, cuando se tengan más datos y posibles formas adicionales.

En los árboles filogenéticos basados en las secuencias concatenadas de los seis genes (Figuras VI.7-VI.9), *Xana* y *Vignysa* aparecen siempre muy separadas, *Vignysa* generalmente próxima a *Hormogaster redii* y *Hormogaster samnitica* recogidas en Córcega y Cerdeña, y *Xana* relacionada con *Hormogaster pretiosa* del sur de Cerdeña y algunas especies de la costa catalana. Esto indicaría una separación muy antigua de ambos géneros y la conveniencia de mantenerlos como géneros independientes.

Sin embargo en el árbol elaborado sólo con los genes nucleares mediante inferencia bayesiana (Figura VI.11), *Xana* y *Vignysa* se agrupan en un clado, cuyas relaciones con las especies de *Hormogaster* recogidas en las localidades de Córcega y Cerdeña, *Hemigastrodrilus* y *Gatodrilus* (véase más adelante), no se pueden resolver bien por aparecer politomías. Los genes nucleares generalmente suministran mejor información a niveles medios o altos, y desde este punto de vista serían más adecuados para establecer la filogenia a nivel género o superior, sobre todo si la separación es muy antigua como parece ser el caso de los Hormogastridae, mientras que los genes mitocondriales serían mucho más adecuados para nivel de especie o población. Por otra parte, a nivel morfológico sería mucho más parsimonioso que la condición con dos mollejas fuese monofilética y hubiese aparecido una sola vez, como sugieren los árboles basados en genes nucleares (Figura VI.11), en lugar de dos veces independientemente

como indican los árboles generales (Figuras VI.7-VI.9) y los basados en datos mitocondriales (Figura VI.10).

Las divergencias genéticas entre *Xana* y *Vignysa* son altas con los genes mitocondriales, superiores a 21% con el COI, y a 15% con el 16S, y con los genes nucleares varían alrededor de 4,40% con el H3 y con el H4 son de 3,29% con *V. vedovinii* y 0,00% con *V. popi*, lo que explica la diferente situación relativa de *Vignysa* y *Xana* con los árboles mitocondriales y nucleares.

Vistos todos estos puntos hemos optado por mantener separados *Vignysa* y *Xana* como dos géneros independientes, pero los resultados de este trabajo no nos autorizan a ir más allá y abordar las Subfamilias y sus posibles relaciones, ya que tanto la morfología, como la filogenia arrojan resultados variables y contradictorios.

*Xana* está representada por una única población que está muy lejana del rango normal de distribución geográfica de la Familia, y el significado evolutivo y filogenético que esto pueda tener tendrá que ser abordado en estudios posteriores, que incluyan un muestreo más detallado de las zonas intermedias entre San Román y el resto de localidades ibéricas donde se han capturado Hormogastridae.

### VII.2.3. *Hemigastrodrilus*

El género *Hemigastrodrilus* está limitado a la vertiente aquitana del macizo central francés, y está representado por una especie *Hemigastrodrilus monicae* Bouché, 1970 habiéndose descrito además una variedad *He. monicae* var. *magna* que según Blakemore (2007) debería llamarse *Hemigastrodrilus monicae magnus*.

Nosotros hemos capturado esta especie en Mende y Cardayre (Francia), donde sólo hemos encontrado la forma típica. Estas dos localidades aparecen siempre agrupadas en todos los árboles filogenéticos, formando un clado independiente en el que nunca se incluyen especies de otros géneros, y que se sitúa casi siempre próximo a *Gatodrilus* (véase más adelante). Morfológicamente *Hemigastrodrilus* se caracteriza según Bouché (1970, 1972) por presentar los poros femeninos muy ventrales, glándulas de Morren desarrolladas y carecer de postmolleja, y aparece exclusivamente en la

vertiente aquitana del macizo Central francés. Según Bouché (1972) los *Hemigastrodrilus* atlánticos se oponen a los *Hormogaster* mediterráneos.

Sus divergencias genéticas con los demás géneros son altas o muy altas, lo que indica que representan un clado bien diferenciado por lo que se propone mantener el género *Hemigastrodrilus*. Las divergencias entre los ejemplares de las dos localidades son medianas o bajas, y no hemos encontrado diferencias morfológicas notables entre ellos, por lo que se ha optado por asignarlos a la forma típica *He. monicae*

### **VII.3. El caso de *Hormogaster elisae*: *Gatodrilus*, un nuevo género de lombrices de tierra de la Familia Hormogastridae**

En todos los análisis realizados, todas las poblaciones de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 del centro de la Península Ibérica se agrupan formando un clado monofilético con buen soporte estadístico (véase capítulo VI) y bien diferenciado del resto de las especies. La especie más cercana en los análisis filogenéticos es *He. monicae*, pero *H. elisae* nunca forma un clado con las otras especies asignadas hasta el momento a *Hormogaster*, salvo en el análisis elaborado por BI (Figura VI.8) en el que se muestra una tritomía siendo la tercera rama la formada por *Xana*, *H. pretiosa*, HPA y *H. najiformis*.

Como se ha indicado más arriba, *Hemigastrodrilus* se caracteriza por presentar los poros femeninos muy ventrales, glándulas de Morren desarrolladas y ausencia de postmolleja (Bouché 1970, 1972). Por el contrario *H. elisae* presenta los poros femeninos por encima de la línea *b*, carece de glándulas de Morren y presenta un pequeño inflamamiento a la altura de los segmentos 16-17, aunque es dudoso que pueda interpretarse como una postmolleja. *H. elisae* comparte estos caracteres con el resto de las especies asignadas hasta ahora a *Hormogaster*, pero puede diferenciarse de ellas por sus espermatecas tubulares muy desarrolladas y por el número de laminillas del tiflosol, cinco, que es marcadamente inferior al del resto de las especies. Los nefridios son muy homogéneos en toda la Familia Hormogastridae (Rota 1993) y tienen por tanto nulo valor diferenciador.

Filogenéticamente, como se ha comentado, *H. elisae* o bien forma un clado con *Hemigastrodrilus*, o se une a ellas el clado formado por *Xana*, *H. pretiosa*, HPA y *H. najaformis*. Por tanto la asignación a género de *H. elisae* es conflictiva. Asignarla a *Hemigastrodrilus* es difícil porque no tiene los mismos caracteres morfológicos definitorios, aunque habitualmente aparezcan juntos en los árboles indicando que es posible que hayan tenido un antecesor común. Con *Hemigastrodrilus* comparte también el hecho de estar geográficamente situadas en la vertiente atlántica, mientras que la mayoría de los Hormogastridae lo están en la vertiente mediterránea.

Asignarla a *Hormogaster* presenta el problema de que este género parece polifilético, con al menos cuatro grupos de especies, (I) las de Córcega, norte de Cerdeña e Italia (*H. samnitica* y *H. redii*); (II) *H. elisae* del centro de la Península Ibérica; (III) el grupo formado por *H. pretiosa* del sur de Cerdeña, HPA, *H. najaformis*; y por último (IV) el gran grupo de especies de Cataluña, Aragón, La Rioja y sur de Francia. Como los soportes estadísticos son bajos y algunos árboles generan politomías, nos ha parecido más prudente mantener el género *Hormogaster* por lo menos para tres de estas líneas y separar la línea que representa *H. elisae* que habitualmente forma un clado separado, bien definido y muy bien soportado estadísticamente, sus divergencias genéticas son suficientemente altas, presenta diferencias morfológicas y está aislada geográficamente.

Las divergencias genéticas entre *H. elisae* y *Hemigastrodrilus* calculadas para los genes COI y 16S-tRNA son similares a las que presenta *H. elisae* con los otros géneros, con el H3 son iguales o superiores que con otros géneros y con el H4 son mucho más altas que con los otros géneros. Los genes mitocondriales posiblemente estén saturados a estos niveles, mientras que los genes nucleares, más adecuados para niveles más altos que el específico, indican una separación clara.

Las divergencias de *Hemigastrodrilus* y *H. elisae* con el resto de las especies de *Hormogaster*, con *Xana* y *Vignysa* son o similares a las divergencias entre ellas o bastante más altas.

En definitiva, los árboles filogenéticos indican que *H. elisae* está próximo a *Hemigastrodrilus*. Morfológicamente *Hemigastrodrilus* se diferencia de *H. elisae* tanto

o más que de los demás géneros, y *H. elisae* es perfectamente distinguible de todas las demás especies por la forma de las espermatecas y el tiflosol, así como por su distribución geográfica limitada al centro de la Península Ibérica. Por tanto, teniendo en cuenta morfología, filogenia y divergencias genéticas proponemos erigir un nuevo género para *H. elisae*, el género *Gatodrilus* por lo que *H. elisae* pasaría a llamarse *Gatodrilus elisae*.

Morfológicamente el género *Gatodrilus* se caracterizaría por la presencia de espermatecas tubulares y tiflosol con cinco láminas, caracteres que permiten diferenciarlo perfectamente de todos los demás Hormogastridae. Filogenéticamente la forma más próxima es el género *Hemigastrodrilus*, con el que comparte su distribución geográfica en la vertiente atlántica, y juntas forman un clado, aunque su separación de los restantes Hormogastridae no muestra un soporte estadístico suficiente para resolver la situación de forma definitiva, y se necesitan trabajos posteriores para confirmar esta hipótesis filogenética de forma clara.

El género *Gatodrilus* contiene al menos cinco especies crípticas (capítulo V), que no vamos a nominar en este momento a falta de un estudio más profundo sobre los procesos de especiación en este grupo, que pensamos realizar próximamente. Se muestrearán las zonas de contacto entre estas especies crípticas y se realizarán experimentos de hibridación en laboratorio, si ello es posible, dada la extrema dificultad de estas especies a cerrar su ciclo biológico en el laboratorio.

Derivatio nominis: *Gatodrilus* hace alusión al origen geográfico, España central, ya que popularmente se denomina gatos a los habitantes de Madrid.

#### **VII.4. *Hormogaster pretiosa*, un rompecabezas taxonómico**

##### **VII.4.1. ¿Qué es *Hormogaster pretiosa*?**

*Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899 fue descrita originalmente como *H. praetiosa* con material procedente de Cagliari, Cerdeña, pero el mismo Michaelsen (1925) la señala en la Península Ibérica, p.e. en Cervera del Maestre (Castellón) y

además crea subespecies como *H. pretiosa hispanica* de Flix (Tarragona) y otras posibles subespecies que deja sin nominar procedentes de capturas entre Peralba y Figuerola de Meyá, en Montsec (Lérida) y entre Pont de Raventí y Guardiola (Barcelona). Posteriormente Álvarez (1977) crea la subespecie *H. pretiosa arrufati* con material de La Vall d'Uixó (Castellón) y Bouché (1970) *H. pretiosa nigra* con material francés, al mismo tiempo que cita *H. pretiosa* en una decena de localidades del sur de Francia situadas en dos áreas del Roussillon y Bouches-du-Rhône. Por tanto se puede comprobar cómo durante mucho tiempo se han venido asignando a esta especie una gran cantidad de ejemplares de hormogástridos procedentes del Levante español y del sur de Francia.

Para la realización de esta memoria, se ha podido capturar material de la localidad Villamassargia, muy próxima a la localidad típica (Cagliari, Cerdeña), y se han podido obtener algunas secuencias que nos han servido para estudiar sus relaciones con todas estas formas continentales que tradicionalmente se han venido asignando a *H. pretiosa*.

Los árboles filogenéticos obtenidos en esta memoria (Figuras VI.7-VI.11) muestran que *H. pretiosa* de Villamassargia, muy cerca de la localidad típica, se agrupa con todos los genes y análisis, con HPA y *H. najaformis* de Ordal, pero nunca forma un clado con las otras especies de *Hormogaster*, ni con otro material asignado a *H. pretiosa* como pudiera ser el procedente de Cervera del Maestre [asignado a *H. pretiosa* por Zicsi (1970)], el de la Vall d'Uixó (presumible *H. pretiosa arrufati*), o *H. pretiosa nigra* de Quillan (Francia), con los que además presenta divergencias genéticas muy altas.

Estos datos sugieren claramente que el nombre *H. pretiosa* debe restringirse para el material del sur de Cerdeña, cuyos parientes más próximos hay que buscarlos en *H. najaformis* de Ordal (Barcelona) y en HPA referencia utilizada por Cobolli Sbordoni *et al.* (1992) para el material capturado cerca del río Ter en Gerona. Estos autores señalan que HPA presentaba divergencias genéticas muy elevadas con el material de Cerdeña, y aunque inicialmente no llegaron a proponer nada concreto, posteriormente Omodeo y Rota (2008) sugieren que debería separarse de *H. pretiosa* y pasar a llamarse *H. hispanica*, nombre que por cierto ya utilizan Qiu y Bouché (1998) en las tablas de su trabajo, pero sin dar ninguna explicación.

Esta propuesta podría ser razonable, pero en esta memoria no podemos apoyarla definitivamente por tres razones, la primera porque del material que nos cedió amablemente P. Omodeo sólo hemos podido extraer y secuenciar ADN de un único ejemplar inmaduro procedente de cerca del río Ter rotulado HPA, pero no de los demás en los que una estancia prolongada en alcohol de 70° parece haber dañado el material genético. La segunda porque no hemos podido capturar material de Flix, localidad típica de *H. pretiosa hispanica* por lo que lo más prudente es esperar hasta capturarlo y poderlo comparar adecuadamente.

*Hormogaster najaformis* Qiu y Bouché, 1998 fue descrita sobre material de Ordal (Barcelona) y se caracteriza sobre todo por sus tubérculos en 19, 20-26 situados en unos salientes laterales muy desarrollados que en cierta medida le hacen parecer una serpiente cobra, de ahí su epíteto específico de *najaformis*. Otro carácter distintivo son sus espermatecas múltiples, dos ó tres pares, muy pequeñas y embutidas en la musculatura que recuerdan a las de *H. pretiosa* de Cerdeña. En los árboles filogenéticos forma siempre un clado, como ya se ha dicho, con *H. pretiosa* y con HPA de Omodeo.

Las divergencias genéticas de esta especie son casi siempre altas o muy altas con la mayoría de las especies estudiadas. No se ha podido secuenciar el COI y el H4 en HPA, pero a pesar de ello los datos son bastante indicativos. Las más próximas son, como era de esperar HPA de Omodeo y *H. pretiosa* de Villamassargia (Cerdeña), con las que presenta divergencias de 19,89% con el gen COI (VIL), de 5,73% (HPA) y 9,78% (VIL) con el fragmento génico 16S-tRNA, de 0,01% (HPA) y 0,62% (VIL) con el gen H3. Las divergencias con todas las demás formas son muy altas y las separan claramente.

Es de lamentar la falta de información morfológica directa sobre HPA, de la que sólo disponemos de un inmaduro, pero los datos de Cobolli Sbordoni *et al.* (1992) sitúan los tubérculos en 22,23-26,27 (bastante más cortos que en *H. najaformis*), los poros de las espermatecas múltiples y en hilera en 9/10 y 10/11 y tiflosol con 15 láminas. Por tanto *H. najaformis* parece muy próxima a *H. pretiosa* de Villamassargia (aunque las divergencias genéticas y las diferencias morfológicas son suficientes para separarlas) y a HPA con la que las divergencias genéticas que conocemos son tan bajas,

que apuntan a la misma especie, pero cuyo estatus como se vio antes es muy dudoso. Por tanto habrá que esperar a tener más datos.

Nuestra propuesta es mantener *H. najaformis* como una buena especie, por lo menos de forma provisional hasta que podamos estudiar una serie más amplia de la localidad donde se capturó HPA (orillas del río Ter a 9 km de Gerona), para dilucidar definitivamente las relaciones entre estas formas.

Por último hay que considerar que existen algunas diferencias morfológicas entre el material rotulado como HPA y la descripción de *H. pretiosa hispanica* de Michaelsen, en concreto HPA según Cobolli Sbordoni *et al.* (1992) presenta los tubérculos en 22,23-26,27 y espermatecas múltiples en 9/10 y 10/11, mientras que la *H. pretiosa hispanica* de Michaelsen tiene los tubérculos en 20-28 y un único par de espermatecas, aunque es cierto que la presencia de un único par de espermatecas sería exclusiva de esta subespecie, ya que no lo presenta ningún otro hormogástrido, por lo que cabe dentro de lo posible que haya habido un error en la descripción de Michaelsen. Esto refuerza la necesidad de capturar nuevo material, redescubrir esta subespecie y asignarle categoría taxonómica.

Las divergencias genéticas con los genes que se pudieron amplificar en este material (material antiguo conservado en alcohol de 70°), como el 8,9% con el 16S-tRNA parecen ser suficientes para separar HPA, pero al no poder apoyarnos en caracteres morfológicos para confirmar si se trata de la *H. pretiosa hispanica* de Michaelsen o de otra subespecie o especie diferente, hemos optado por ser prudentes, y no hacer de momento ninguna nueva propuesta sobre el estatus específico o subespecífico de *H. pretiosa hispanica*. Queda para trabajos futuros realizar muestreos en Flix y en la localidad de procedencia de HPA para dilucidar esta cuestión.

En cualquier caso queda claro que la filogenia molecular indica que *H. pretiosa* debe restringirse por el momento al material de Cerdeña, y que todas o la mayoría de sus citas en la Península Ibérica y sur de Francia probablemente correspondan a otras especies. Cualquier otra cosa supondría una sorpresa. Una cuestión para el futuro próximo es estudiar la variabilidad de *H. pretiosa* en Cerdeña, muestreando varias localidades más, para ver si se ha producido especiación durante los millones de años



que lleva separada de sus formas más afines, y en caso positivo si esta especiación se ha plasmado en caracteres morfológicos o se ha mantenido como especiación críptica.

La descripción de *H. pretiosa* así redefinida, sería la de Michaelsen (1899), completada en algunos caracteres no observados por este autor con datos de Omodeo (1956) y datos de esta memoria.

Michaelsen (1899) señala en su material de Cagliari un tamaño de hasta 36 cm, hasta 600 segmentos, quetas geminadas de forma que  $aa$  es aproximadamente igual que  $dd$ , y  $ab = 2cd$ , clitelo en (13) 14-30 y tubérculos pubertarios en 20-26. Omodeo (1956) completa esta descripción con material procedente de Cagliari y Tuili, ambas en Cerdeña, con dimensiones entre 260 y 340 mm y entre 398 y 509 segmentos, y hace notar que las quetas son pequeñísimas y no se ven en la mitad posterior del cuerpo, señalando que  $ab$  es “ligeramente mayor” que  $cd$ . El clitelo estaría en 13-29, 30, los tubérculos en 22-28, 29 y las espermatecas, son pequeñísimas y están ocultas en el espesor de la pared del cuerpo y los septos, por lo que son difíciles de ver; se sitúan en los intersegmentos 9/10 y 10/11 entre  $cd$  y la línea medio dorsal, en grupos de dos a cuatro ordenados transversalmente; además los ejemplares que no han llegado a una madurez completa carecen de espermatecas.

Nuestros ejemplares de Villamassargia (situada a unos 40 km de Cagliari, Cerdeña) coinciden en lo sustancial con los descritos por Omodeo (1956), presentan el clitelo en (12, 13), 14-30, los tubérculos en 22-26, 27, tienen espermatecas múltiples en 9/10 y 10/11 bajo la forma de bolsas pequeñísimas embutidas en la musculatura, dos ó tres a cada lado en 9/10 y seis a cada lado en 10/11, aunque es posible que esto sea variable. Sólo los ejemplares totalmente maduros las presentan, y no las hemos podido ver en ejemplares postclitelaes aunque tuviesen todavía el clitelo visible. El tiflosol presenta once láminas, carácter no descrito por los autores antes citados.

Zicsi (1970) y Bouché (1972) asignaron a *H. pretiosa* diverso material procedente de España y Francia, pero no citan la presencia de espermatecas múltiples, por lo que presumiblemente este material pertenezca a otra u otras de las especies del género.

El material de Quillan (Francia) capturado por nosotros y asignable morfológicamente a *H. pretiosa nigra* se sitúa en los árboles filogenéticos formando un clado con *H. catalaunensis* y *H. gallica*, dentro del gran grupo formado por la mayoría de las formas catalanas, aragonesas, riojanas y del sur de Francia, pero muy lejos de *H. pretiosa* del sur de Cerdeña, por lo que nuestra propuesta es elevarla a categoría de especie como *Hormogaster nigra*. Esta propuesta está fundamentada en su posición en los árboles filogenéticos, en sus divergencias con *H. pretiosa* de Villamassargia (COI: 21,52%, 16S-tRNA: 13,9%, H3: 3,76%, H4: 4,60%), y en la morfología, aunque sólo sea por su gran tamaño y color oscuro, ya que el resto de los caracteres son muy similares a las otras especies.

#### VII.4.2. ¿Qué es *Hormogaster pretiosa* de la Península Ibérica y sur de Francia?

En España se ha citado también *H. pretiosa* de localidades como Cervera del Maestre (*H. pretiosa typica*) o La Vall d'Uixo (*H. pretiosa arrufati*) localidades que aparecen siempre en un clado diferente que el material típico de Cerdeña y que presentan altas divergencias genéticas con él. En el sur de Francia se ha citado también *H. pretiosa nigra*. Además Qiu y Bouché (1998) describieron once nuevas especies procedentes de diferentes localidades del este español, algunas de las cuales presentan caracteres parecidos a los de *H. pretiosa*, creándose así un rompecabezas taxonómico que necesita ser resuelto de forma urgente si se quiere llegar a entender la filogenia de este complejo de especies.

Hay un conjunto de cinco estaciones que siempre forman un clado estrechamente relacionado y que no se mezcla con otras localidades en ninguno de los árboles filogenéticos. Se trata de Cervera del Maestre (donde está citada *H. pretiosa*), La Vall d'Uixó (localidad de donde se describió *H. pretiosa arrufati*), Querol (localidad típica de *H. castillana*), Talarn (localidad típica de *H. lleidana*) y Loporzano (localidad típica de *H. huescana*).

Nosotros hemos podido capturar ejemplares en estas cinco localidades, y en todos los casos, hay diferencias morfológicas con *H. pretiosa* tal y como se ha redefinido más arriba, tanto externas como internas y centradas sobre todo en la

ausencia de espermatecas múltiples. Estas diferencias son lógicas, incluso en las formas asignadas a *H. pretiosa* dado lo incompleto de la descripción de Michaelсен.

Nuestro material salvo el procedente de Talarn (Lérida) coincide perfectamente en sus caracteres morfológicos con la especie descrita en cada localidad. Es excepción el caso de Talarn, donde en un primer viaje no conseguimos capturar ejemplares maduros, pero sí en una segunda visita. Estos ejemplares no coinciden morfológicamente con *H. lleidana*. Se trata de ejemplares grandes, de los que el único maduro mide 230 mm, pesa 15,60 g, clítelos en 15-30, tubérculos en 21-27, tres pares de espermatecas en 8/9, 9/10 y 10/11 y tiflosol con 19 láminas, por lo que se parece mucho más a los ejemplares de Loporzano, Cervera del Maestre, La Vall d'Uixó y Querol que a *H. lleidana*, que es una de las dos especies descritas de Hormogastridae que no hemos podido capturar y que por tanto se quedan sin estudiar en esta memoria.

Loporzano es siempre la localidad más externa en este grupo de cinco, y sus divergencias con las otras cuatro poblaciones son un poco más elevadas que las que hay entre ellas, con el COI en el rango de 8,45% a 10,12%, con el 16S-tRNA presenta de 1,83% a 2,41%, con el H3 presenta de 0,14% a 0,76% y con el H4 presenta 0,00%. Esto unido a las pequeñas diferencias morfológicas llevaría a considerar que se puede mantener la especie *H. huescana*, pero esta especie es muy próxima a *H. castellana*.

Por tanto las otras cuatro estaciones de este grupo representan la misma especie, que debe nominarse como *H. castellana* (*lapsus* de Qiu y Bouché (1998) que querían referirse a Castellón, por lo que el nombre adecuado hubiese sido *castellonensis*, pero en cualquier caso *castellana* representa un nombre válido aunque no se refiera a Castilla e introduzca una confusión geográfica).

El material que hemos capturado en La Vall d'Uixó, localidad típica de la subespecie *H. pretiosa arrufati*, coincide a grandes rasgos con la descripción de Álvarez salvo en la posición de las espermatecas, que Álvarez sitúa en los septos 8/9 y 9/10, y nosotros hemos visto un segmento más atrás en 9/10 y 10/11. El tiflosol tiene un máximo 23 láminas (21 + 2 muy pequeñas y difíciles de ver), y no hemos podido observar nada que recuerde a las glándulas de Morren. Clítelos en (13)14-30 y tubérculos pubertarios (20) 21- 28 (29) coinciden con lo descrito por Álvarez.

El material de la Vall d'Uixó se sitúa en todos los árboles filogenéticos estrechamente asociado al de Querol (*H. castillana*), Cervera del Maestre (supuesta *H. pretiosa*), Talarn, y en menor grado Loporzano (*H. huescana*). Teniendo en cuenta la filogenia y las divergencias genéticas, nuestra propuesta es que esta subespecie puede mantenerse, pero no dentro de *H. pretiosa* sino dentro de *H. castillana*, especie a la que se asignarían las formas de Querol, Cervera del Maestre, La Vall d'Uixó y Talarn. Se trataría por tanto de *Hormogaster castillana arrufati*.

## VII.5. Las restantes especies del este de España y sur de Francia

### VII.5.1. *Hormogaster pretiosiformis* y *Hormogaster oroeli*.

*Hormogaster pretiosiformis* fue descrita por Zicsi (1970) sobre material procedente de Monrepós (Huesca). Un año después Álvarez (1971) describe la subespecie *H. pretiosoides* (sic) *oroeli* procedente de Peña Oroel (Huesca), que posteriormente eleva a categoría de especie como *Hormogaster oroeli*.

Nosotros hemos capturado material de *H. pretiosiformis* en Monrepós y de *H. oroeli* en Peña Oroel (Huesca). Nuestros ejemplares de *H. pretiosiformis* coinciden con la descripción de Zicsi: clitelo 15-27, tubérculos 19, 20-26, 27 y tiflosol con 19 láminas, pero hay una diferencia en el número de espermatecas, ya que Zicsi cita cuatro pares en 9, 10, 11 y 12 con poros en 8/9, 9/10, 10/11 y 11/12, y nosotros sólo hemos encontrado tres pares que abren en 8/9, 9/10 y 10/11.

En lo que se refiere a *H. oroeli* nuestros ejemplares coinciden perfectamente con la descripción de Álvarez y presentan el clitelo en 14, 15-26, 27, los tubérculos en 19, 20-26, 27, tienen tiflosol con 19 láminas y tres pares de espermatecas que abren en 8/9, 9/10 y 10/11. Las diferencias morfológicas entre *H. pretiosiformis* y *H. oroeli* son mínimas (básicamente el par adicional de espermatecas descrito por Zicsi y que nosotros no hemos visto), por lo que no es de extrañar que Álvarez le asignara inicialmente estatus de subespecie.

El los árboles filogenéticos, *H. pretiosiformis* y *H. oroeli* aparecen siempre juntas formando un clado en el que nunca se incluye ninguna otra especie. Este clado forma un clado superior con las cinco estaciones del grupo de Querol con muy buen soporte estadístico en el árbol de BI (Figura VI.8) y bajos soportes en los otros árboles generales (Figuras VI.7 y VI.9). Las divergencias genéticas entre esas especies son muy bajas, COI: 6,29%, 16S-tRNA: 1,29%, H3: 0,00%, H4: 0,20%, lo que indica que estas dos formas están muy próximas y que se puede cuestionar que sean dos especies separadas, ya que las divergencias son similares a las del nivel subespecie.

Teniendo en cuenta que morfológicamente son muy parecidas (sólo habría la diferencia en el número de espermatecas que no hemos podido confirmar en nuestro material), la posición en los árboles filogenéticos y las divergencias genéticas, nuestra propuesta es restituir *H. oroeli* al estatus de subespecie con el que fue descrita originalmente por Álvarez, por lo que pasaría a denominarse *H. pretiosiformis oroeli*.

*H. pretiosiformis* está muy próxima en divergencia genética y posición en los árboles al gran grupo de especies del este de España y sur de Francia, especialmente a *H. huescana* de Loporzano con la que presenta una divergencia del 9,96% con el COI y del 1,30% con el 16S-tRNA, pero hay diferencias morfológicas suficientes (en *H. huescana*, según Qiu y Bouché (1998), el clitelo está en 15-30, los tubérculos en 24-30, tiene dos pares de espermatecas y 17 láminas en el tiflosol) para mantenerlas como especies separadas. Sin embargo la posición en los árboles y las bajas divergencias genéticas comparativamente con otras especies, la sitúan claramente como emparentada con este gran grupo, que es posible que pueda ser mejor definido en el futuro cuando se pueda realizar un mayor esfuerzo de muestreo en esta zona tan extremadamente interesante por su fauna de lombrices de tierra.

#### **VII.5.2. *Hormogaster eserana* y material de Peralba**

*Hormogaster eserana* Qiu y Bouché, 1998 fue descrita sobre material procedente de Graus (Huesca) y se caracteriza por su clitelo en 14-30, tubérculos en 22-28, poróforos masculinos muy reducidos, dos pares de espermatecas en 9/10 y 10/11 y tiflosol con 17-18 láminas, caracteres que como se puede ver son relativamente parecidos a los de otras especies, señalando los autores su gran parecido con *H. pretiosa*

de la que se diferenciaría por los poróforos masculinos reducidos y las espermatecas simples.

En los diferentes árboles filogenéticos aparece siempre formando clado con el material capturado en Peralba, localidad situada a unos 50 km, siendo excepción el árbol elaborado con genes nucleares (Figura VI.11) en el que a este nivel aparece una politomía múltiple. En esta localidad, Michaelsen (1925) mencionó la existencia de una subespecie de *H. pretiosa* a la que no puso nombre por disponer de poco material y en no buen estado.

Morfológicamente Michaelsen (1925) indica que el clitelo está en 12,13-31-32, no sitúa los tubérculos pubertarios y no indica la posición de las espermatecas. Nuestro material de Peralba es de color marrón oscuro, los ejemplares maduros miden de 20 a 25 cm y tienen entre 458 y 605 segmentos, presentan el clitelo bastante difuso y por tanto con límites variables, puede aparecer en 12, 13,14-30,31, siempre bien marcado en 15-30 y más difuso anterior y posteriormente, los tubérculos están 23-28 (29), presenta dos pares de espermatecas en 9/10 y 10/11 y tiflosol con 17-18 láminas.

Estos caracteres muestran pequeñas diferencias con la *H. pretiosa hispanica* de Michaelsen, sobre todo en la posición de los tubérculos y muchas semejanzas con *H. eserana* salvo el tamaño de los poróforos masculinos, carácter que posiblemente tenga mucho que ver con el estado de madurez sexual o con el momento del ciclo biológico.

Las divergencias genéticas entre el material de Graus y Peralba son muy bajas, 6,05% con el COI, 1,49% con el 16S-tRNA, 0,31% con el H3 y 0,00% con el H4 lo que sugiere que se trata del mismo taxón. Sus formas más próximas son las del gran grupo del este de España, sureste de Francia, con las que muestra distancias mas bajas que con el resto de especies estudiadas, pero siempre compatibles con nivel de especie, por ejemplo con el gen COI las distancias con ese grupo son de alrededor del 12% y con el resto superiores al 15%. Sus distancias con *H. pretiosa* de Cerdeña son muy altas en todos los casos, 20,49% y 20,42% con el COI.

Todos estos datos nos llevan a proponer que la subespecie de *H. pretiosa* no nominada por Michaelsen (1925) puede incluirse en *H. eserana* que puede considerarse

como una buena especie, aunque eso sí muy próxima a todo el conjunto de formas que aparecen en el este español y sureste francés.

### VII.5.3. *Hormogaster arenicola*

*Hormogaster arenicola* Qiu y Bouché, 1989 fue descrita con material procedente de Biosca (Lérida), y se caracteriza por presentar el clitelo en 14-28, los tubérculos en 19-26, tiflosol con 14 láminas y dos pares de espermatecas. Nosotros hemos muestreado esta misma localidad y hemos capturado ejemplares que coinciden con estos caracteres, salvo el tiflosol que presenta 15 láminas, lo que es una diferencia mínima. Por tanto este material puede asignarse al *H. arenicola* de Qiu y Bouché.

Morfológicamente esta especie parecida a *H. pretiosiformis* de la que se diferencia entre otros caracteres por clitelo y espermatecas. También presentan caracteres similares *H. riojana* y *H. ireguana*, aunque hay diferencias en alguno de los caracteres importantes como clitelo, tubérculos o número de láminas del tiflosol. La separación de las otras especies del género es posible en base a los caracteres morfológicos.

En algunos árboles filogenéticos forma un clado con *H. riojana* y *H. ireguana* (MP y BI), mientras que se une con *H. eserana* de Graus y de Peralba (véase más arriba) en el árbol ML. Su posición por tanto no es estable, pero siempre se incluye dentro del grupo de formas del este español y sur de Francia.

Las divergencias genéticas con todas las especies son bastante altas. Con el COI presenta un 15,96% con *H. eserana* de Peralba, el 16,28% con *H. eserana* de Graus, el 19,04% con *H. riojana* de Alesanco y el 19,96% con *H. ireguana* de Torrecilla. Con los otros genes la situación es similar, las distancias con estas cuatro localidades son más bajas que con el resto, pero suficientes para considerar que *H. arenicola* puede representar una buena especie.

#### VII.5.4. Las formas de La Rioja: *Hormogaster riojana* y *Hormogaster ireguana*

*Hormogaster riojana* Qiu y Bouché, 1998 y *Hormogaster ireguana* Qiu y Bouché, 1998 fueron descritas con material procedente de La Rioja, en concreto de Alesanco y Torrecilla respectivamente, localidades separadas por unos 30 km de distancia. Nosotros hemos podido capturar material en ambas localidades que puede ser asignado a la especie descrita en cada una de ellas. *H. riojana* presenta clitelo en 13,14, 15-27, 28, tubérculos en (20) 21-27, dos pares de espermatecas del tipo de varios acúmulos de esperma (véase más adelante) y tiflosol con un máximo de 15 láminas. Hay que señalar que algún ejemplar de la población estudiada puede presentar tres pares de espermatecas, aunque el número habitual es de dos pares.

*H. ireguana* es parecida con clitelo en 13-27, tubérculos en 19-26, tres pares de espermatecas del mismo tipo en 8/9, 9/10 y 10/11 siendo más grandes las posteriores y tiflosol con un máximo de 18-19 láminas. Como se puede apreciar hay algunas diferencias morfológicas en la posición de los tubérculos, espermatecas y número máximo de láminas del tiflosol.

En los árboles filogenéticos *H. riojana* y *H. ireguana*, (Figuras. VI.7, VI.8 y VI.9) forman siempre un clado en el que no se incluye nunca ninguna especie más. La especie más próxima generalmente es *H. arenicola* con la que forma un clado en varios árboles, aunque esto no sucede en todos. Parece por tanto que *H. riojana* y *H. ireguana* son dos especies muy próximas filogenéticamente.

Las divergencias genéticas no son comparativamente muy altas. Con el COI son del 10,15%, con el resto de las especies del grupo que hemos denominado del este de España y sur de Francia son del 15 al 19%, y con todas las demás superiores a 19 o 20%. Con el fragmento 16S-tRNA muestran una divergencia del 4,05%, del 6 al 9% con las del este de España y sur de Francia, y superiores al 10% con el resto. Con el H3 su divergencia es del 0,00%, del 0,6 al 1,2% con las del este de España y sur de Francia, y superior al 3% con el resto.

Estas divergencias nos dicen que estas dos especies están muy próximas, precisamente en el intervalo en que es dudoso que las divergencias correspondan al



nivel especie o subespecie. Como existen algunas diferencias morfológicas en la posición de los tubérculos, el número máximo de láminas del tiflosol y el número de espermatecas (aunque ya se ha indicado que algún ejemplar de *H. riojana* puede presentar excepcionalmente tres pares), nuestra propuesta es mantenerlas como dos especies separadas, aunque son tan próximas que tampoco sería de extrañar que en el futuro pudiesen aparecer formas intermedias, o con mezcla de caracteres que llevasen a reconsiderar esta propuesta.

#### **VII.5.5. *Hormogaster gallica* y *Hormogaster catalaunensis***

*H. gallica* Rota, 1993 fue descrita con material procedente de Banyuls-sur-Mer y La Fare les Oliviers del sur de Francia. Nosotros hemos podido capturar material en Banyuls-sur-Mer, aunque sólo un ejemplar que además estaba en fase de estivación. Rota (1993) sitúa el clitelo en 13,14-28,29,39 y los tubérculos en 22,23,24-27; el tiflosol presenta un máximo de 13 láminas y las espermatecas aparecen en la cara anterior de los septos 9/10 y 10/11 y las describe como sésiles, múltiples, dispuestas en un círculo, las anteriores de menor tamaño, y Rota (1993) señala que cualquiera de los “dos pares” puede faltar, lo que parece indicar que las espermatecas pueden no ser de tipo múltiple, en el sentido utilizado en esta memoria, sino del tipo aplanado con varios acúmulos. Curiosamente en la figura que acompaña la descripción dibuja múltiples poros de las espermatecas formando dos grupos en 9/10 y 10/11.

Esta cuestión puede tener cierta importancia filogenética, porque las espermatecas múltiples (pequeñas, separadas y cada una con su poro) están limitadas a *H. pretiosa* s.s., *H. samnitica lirapora* y *H. najaformis* y podrían representar una condición propia de una línea filogenética restringida a las islas (y las especies emparentadas del nordeste de la Península Ibérica), cosa que no sería así si realmente *H. gallica* presenta espermatecas múltiples.

Hay que señalar aquí el problema existente con la terminología aplicada las espermatecas, ya que el término múltiple parece utilizarse tanto cuando aparecen varias espermatecas pequeñas claramente separadas topográficamente (como sucede en *H. pretiosa* s.s., como cuando estos órganos adoptan una forma aplanada de plato o disco en el que se pueden diferenciar varios acúmulos de esperma separados, pero que

desembocan por un único poro. El único ejemplar que pudimos capturar estaba en fase de estivación y no presentaba el genital perfectamente desarrollado. El clítelos, no del todo marcado está en 14-30, los tubérculos en (23)24-27, y hay un máximo de 13 láminas en el tiflosol. Las espermatecas no se ven bien porque parecen estar vacías y son del tipo de las de varios acúmulos de esperma. Este material puede asignarse a *H. gallica*, quedando pendiente capturar más material para saber exactamente el tipo de espermatecas presente.

En todos los árboles filogenéticos generales, *H. gallica* forma un clado con *H. catalaunensis*, clado en el que nunca se incluye ninguna otra especie. La más próxima es *H. nigra* (véase más arriba) que se agrega a estas dos para formar un clado superior que está dentro del conjunto de formas del este de España y sur de Francia. Hay que mencionar que en el árbol de BI sólo con los genes nucleares estas tres especies junto con *H. sylvestris* y la especie nueva *H. abbatissae* (véase más adelante) forman uno de los tres clados en los que se divide la Familia, siendo el soporte estadístico muy alto.

*H. catalaunensis* fue descrita por Qiu y Bouché (1989) con material procedente de El Brull (Barcelona). Morfológicamente presenta el clítelos en ½ 14-30, tubérculos en 22-28, un máximo de once láminas en el tiflosol y dos pares de espermatecas en 9/10 y 10/11. Nuestro material coincide prácticamente en todo, salvo en que el clítelos puede ocupar el segmento 31.

Las divergencias genéticas entre estas especies con el COI son del 11,49% entre *H. gallica* y *H. catalaunensis*, con *H. nigra* son del orden del 13%, luego hay un par de valores del 16% y el resto son superiores al 20%. Este mismo panorama se dibuja con los otros genes, con el fragmento 16S-tRNA las divergencias son del 2,85% entre *H. gallica* y *H. catalaunensis*, de alrededor del 6% con *H. nigra* y próximas o superiores al 8% con las demás especies. El gen H3 arroja divergencias del 0,61% entre ellas, del 1,54% con *H. nigra* y mayores del 3% con las demás. Por último con el gen H4 aparecen divergencias del 0,55% entre ellas, de este mismo orden con *H. nigra* y superiores al 1,6% con las restantes. Por tanto parece claro que *H. gallica* y *H. catalaunensis* son dos especies muy próximas, morfológicamente casi indistinguibles, geográficamente cercanas (alrededor de 100 km), pero sus divergencias genéticas están dentro de los valores normalmente asignados a especies diferentes, aunque también es

cierto que están en esa frontera, alrededor del 10% con el COI, en la que es muy difícil asegurar nada.

Por tanto nuestra propuesta es mantener provisionalmente *H. catalaunensis* y *H. gallica* como especies diferentes, a la espera de poder estudiar mejor la estructura de las espermatecas de *H. gallica*. Si estas son realmente múltiples, en el sentido de esta memoria, se podrían mantener las dos especies separadas, si son del tipo de varios acúmulos de esperma habría que reconsiderar esta posición y posiblemente rebajar *H. catalaunensis* a una subespecie de *H. gallica*.

#### **VII.6. Las formas orientales: *Hormogaster redii* y *Hormogaster samnitica***

En esta memoria se ha estudiado molecularmente sólo el material procedente de Córcega y Cerdeña, ya que no se ha podido extraer ADN del material suministrado por Pietro Omodeo, procedente de la Isla de Elba. *Hormogaster redii* Rosa, 1887 aparece en Córcega, Cerdeña, Península italiana, islas adyacentes y norte de África. Es posiblemente una de las especies más fáciles de caracterizar, ya que tiene un tamaño generalmente inferior a *H. pretiosa*, con la que puede aparecer en la misma localidad, y además presenta una disposición típica de las quetas, con las quetas *ab* bastante separadas, mientras las *cd* son geminadas, característica que individualiza claramente a esta especie dentro de la Familia.

De *H. redii* hemos podido estudiar material procedente de Alghero, Iglesias y Ghilarza (Cerdeña) que morfológicamente coincide con la forma típica, clítelos en 13,14-24,25, tubérculos pubertarios en 17,18,19-24,25, tres pares de espermatecas en 9/10, 10/11 y 11/12 y tiflosol con siete láminas. También hemos capturado material procedente de Volpajola (Córcega) que coincide con la subespecie *H. redii insularis* Bouché, 1979 que se diferencia de la forma típica por sus tubérculos de mayor extensión, 15,16-28, 29 y tres pares de espermatecas en 10/11, 11/12 y 12/13 en nuestro material, y en 11 (dos pares) y 12 según Bouché. El tiflosol tiene diez láminas según Bouché y nueve en nuestro material con dos muy pequeñas y extremadamente difíciles de ver.

En esta memoria hemos estudiado material de *Hormogaster samnitica* Cognetti, 1914 procedente del Col de La Testa (Córcega), que por sus características puede asignarse a la subespecie *H. samnitica lirapora* Bouché, 1970. Lamentablemente no hemos podido extraer ADN del material de la Isla de Elba cedido por Omodeo, que morfológicamente se corresponde con la forma típica de la especie descrita por Cognetti.

En los árboles filogenéticos (véase capítulo VI) estas dos especies aparecen siempre juntas y sus localidades nunca forman clado con otras especies, siendo las más próximas en varios árboles las especies de *Vignysa*. Parece claro por tanto que forman una estirpe evolutiva independiente, cuyas formas más próximas habría que buscarlas en las *Vignysa* del sur de Francia.

Las divergencias genéticas de *H. samnitica lirapora* con los ejemplares de *H. redii* de las otras cuatro localidades son muy altas con los genes mitocondriales, de 18,50 a 19,74% con el COI, y 9,53 a 10,35% con el 16S-tRNA, y medias o bajas con los nucleares, de 0,31 a 2,20% con el H3 y 0 a 0,75% con el H4. Morfológicamente nuestros ejemplares coinciden prácticamente en todo con la descripción de Bouché, incluyendo las espermatecas múltiples, salvo en que Bouché cita espermatecas en el 9 que nosotros no hemos podido encontrar en nuestro material. No hemos podido estudiar molecularmente material típico de *H. samnitica* por lo que nuestra propuesta en este momento es mantener *H. samnitica* como una buena especie y mantener también el estatus de *H. samnitica lirapora* como subespecie, a la espera de poder realizar un estudio más detallado incluyendo material típico italiano.

Nuestro material de Volpajola (Córcega) corresponde a *H. redii insularis*. Sus divergencias genéticas con el material de las otras tres localidades de *H. redii* y con *H. samnitica lirapora* son muy altas con los genes mitocondriales, de 19,09 a 23,09% con el gen COI y de 9,53 a 11,26% con el fragmento 16S-tRNA, y más bajas con los nucleares, de 0,92 a 2,20% con el H3 y de 0 a 0,75% con el H4. Hay que remarcar que las divergencias con otra especie, *H. samnitica lirapora* son iguales o incluso más bajas que las que presenta con material de otras localidades supuestamente de su propia especie, lo que nos indica que *H. redii insularis* difícilmente puede mantenerse como una subespecie de *H. redii*. Nuestra propuesta, basada en las diferencias morfológicas

citadas más arriba y en las divergencias genéticas, es la de elevar *H. redii insularis* a la categoría de especie, pasando a llamarse *Hormogaster insularis* y teniendo como diagnosis la de Bouché (1970) para la subespecie.

Una cuestión interesante es la de las divergencias genéticas que presentan entre ellas *H. redii* de Alghero, Iglesias y Ghilarza que oscilan entre el 12,64% y el 16,07% con el COI, y el 5,73% a 11,26% con el 16S-tRNA, divergencias que son similares o más altas que las propuestas en el capítulo V de esta memoria para establecer la presencia de especies crípticas en *Gatodrilus elisae*, y por Herbert *et al.* (2003) para separar especies en anélidos (véase el capítulo IV para más referencias sobre estos aspectos).

Morfológicamente el material de *H. redii* de estas tres localidades es muy parecido, con mínimas variaciones en el clitelo, tubérculos pubertarios en 17, 18-24, 25, tiflosol con siete láminas y tres pares de espermatecas en los septos 9/10, 10/11 y 11/12 (es excepción el único ejemplar de Alghero que no es totalmente maduro y presenta sólo dos pares). Por esta razón nuestra propuesta es que esta especie se encuentra en un proceso de especiación críptica, formándose nuevas especies con divergencias genéticas altas, pero no vamos a formalizar estas especies y erigir nuevas especies no tanto por la falta de caracteres morfológicos definitorios que nos permitan diferenciarlas, como porque creemos que es necesario profundizar en el muestreo para obtener una mayor representación de la divergencia genética que se puede estar produciendo, sus intervalos de variación y sus pautas.

Parece claro que Córcega y Cerdeña pueden representar auténticos laboratorios biológicos en los que se están produciendo procesos de especiación dentro de los Hormogastridae, de forma similar a lo que está sucediendo con *Gatodrilus* en España central, por lo que el estudio de su fauna cobra un gran interés desde el punto de vista de la Biología Evolutiva y los procesos de especiación. Esperamos poder profundizar en estos aspectos en los próximos años.

Nombre actual	Propuesta
<i>Vignysa vedovinii</i>	<i>Vignysa vedovinii</i>
<i>Vignysa popi</i>	<i>Vignysa popi</i>
<i>Xana omodeoi</i>	<i>Xana omodeoi</i>
<i>Hemigastrodrilus monicae</i>	<i>Hemigastrodrilus monicae</i>
<i>Hormogaster pretiosa</i>	<b>Limitar este nombre al material del sur de Cerdeña</b>
<i>Hormogaster pretiosa nigra</i>	<b><i>Hormogaster nigra</i></b>
<i>Hormogaster pretiosa</i> de Cervera del Maestre	<b><i>Hormogaster castillana</i></b>
<i>Hormogaster pretiosa arrufati</i>	<b><i>Hormogaster castillana arrufati</i></b>
<i>Hormogaster castillana</i>	<i>Hormogaster castillana</i>
<i>Hormogaster huescana</i>	<i>Hormogaster huescana</i> *
<i>Hormogaster elisae</i>	<b><i>Gatodrilus elisae</i> (con especies crípticas)</b>
<i>Hormogaster gallica</i>	<i>Hormogaster gallica</i>
<i>Hormogaster catalaunensis</i>	<i>Hormogaster catalaunensis</i> *
<i>Hormogaster najaformis</i>	<i>Hormogaster najaformis</i>
<i>Hormogaster ireguana</i>	<i>Hormogaster ireguana</i>
<i>Hormogaster riojana</i>	<i>Hormogaster riojana</i>
<i>Hormogaster samnitica lirapora</i>	<i>Hormogaster samnitica lirapora</i>
<i>Hormogaster redii</i> (ALG, GHI, IGL)	<i>Hormogaster redii</i> (¿especies crípticas?*)
<i>Hormogaster redii insularis</i>	<b><i>Hormogaster insularis</i></b>
<i>Hormogaster arenicola</i>	<i>Hormogaster arenicola</i>
<i>Hormogaster eserana</i>	<i>Hormogaster eserana</i>
<i>Hormogaster pretiosiformis</i>	<i>Hormogaster pretiosiformis</i>
<i>Hormogaster oroeli</i>	<b><i>Hormogaster pretiosiformis oroeli</i></b>
<i>Hormogaster sylvestris</i>	<i>Hormogaster sylvestris</i>
<i>Hormogaster multillamela</i>	No estudiada
<i>Hormogaster lleidana</i>	No estudiada

**Tabla VII.1.** Propuestas taxonómicas a la luz de los resultados filogenéticos y morfológicos. Un asterisco marca propuestas provisionales que deberán ser confirmadas posteriormente. Se han marcado en negrita los cambios propuestos.



**VIII. *Hormogaster abbatissae*, nueva especie de**  
**Hormogastridae procedente de Sant Joan de les Abadesses**  
**(Gerona, España)**





**VIII. *Hormogaster abbatissae*, nueva especie de Hormogastridae procedente de Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España)**

**RESUMEN**

Se describe una nueva especie de una lombriz de tierra de la Familia Hormogastridae, *Hormogaster abbatissae*, procedente de Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España). Se comparan sus caracteres anatómicos y morfológicos con los de las especies más próximas y se tienen en cuenta también su filogenia basada en datos moleculares y sus distancias genéticas con las especies próximas para el establecimiento de esta nueva especie.

**ABSTRACT**

A new earthworm species of Hormogastridae is described, *Hormogaster abbatissae*, collected in Sant Joan de les Abadesses (Gerona, Spain). Its anatomical and morphological characters are compared to the ones presented by the more similar species. The molecular phylogeny and genetic divergences with the closer species are also considered for the establishment of this new species.

### VIII.1. Introducción

Los Hormogastridae son una Familia de lombrices de tierra de tamaño medio o grande, muy importante para el funcionamiento de los suelos en los ecosistemas mediterráneos (Bouché 1972), que comprende actualmente 22 especies y varias subespecies que habitan exclusivamente en la zona oeste del Mediterráneo (Díaz Cosín *et al.* 1989, Cobolli Sbordoni *et al.* 1992). La mayor abundancia de especies parece darse en el nordeste español donde hay descritas más de una docena de especies.

La primera especie descrita fue *Hormogaster redii* Rosa, 1887, seguida de *Hormogaster pretiosa* Michaelsen, 1899. Posteriormente han descrito especies autores como Cognetti (1914), Zicsi (1970), Bouché (1970), Álvarez (1971,1977), Díaz Cosín *et al.* (1989), Rota (1993) y sobre todo Qiu y Bouché (1998) que describieron once nuevas especies procedentes de España. Las especies conocidas se agrupan en cuatro géneros, *Hormogaster* Rosa (18 especies), *Hemigastrodrilus* Bouché (una especie), *Vignysa* Bouché (dos especies) y *Xana* Díaz Cosín *et al.* (una especie).

Omodeo (1956) realizó una revisión de la Familia, y Omodeo y Rota (2008) hacen algunas consideraciones sobre su evolución en un trabajo sobre varias zonas del Mediterráneo. Cobolli Sbordoni *et al.* (1989) estudiaron mediante alozimas la filogenia de la Familia, pero este interesante trabajo adolece de un muestreo mucho más detallado del nordeste español, donde parece concentrarse la mayor diversidad de la Familia (Qiu y Bouché (1998).

En el curso del estudio filogenético presentado en el capítulo VI de esta memoria, se capturaron cerca de Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España), 22 ejemplares de una especie, asignable al Género *Hormogaster* que creemos representa una nueva especie a la que hemos nominado *Hormogaster abbatissae*. Su descripción, y el estudio de sus relaciones con los otros Hormogastridae son los objetivos de este capítulo.

## VIII.2. Materiales y métodos

Los ejemplares se capturaron mediante extracción manual, y se fijaron en el campo en alcohol de 96° que se renovó varias veces; una vez en el laboratorio se conservaron dentro del alcohol en congelador a -20°C.

El material estudiado es el siguiente: 22 ejemplares (cinco maduros, cuatro semimaduros con tubérculos y/o esbozo de clítelos y trece inmaduros o fragmentos), recogidos entre Ripoll y Sant Joan de les Abadesses, carretera C26, km 210 en un pequeño bosque cerca del río Ter, Latitud: N 42°13'30,0'', Longitud: E 2°14'57,5''. El sitio concreto es un pequeño bosque de *Populus alba*, *Acer pseudoplatanus* y *Rosa canina*, que se desarrolla en un talud en el borde de una pradera. El suelo estaba cubierto de abundante hojarasca (Figura VIII.1.A).

Características del suelo: arena gruesa: 13,57%, arena fina: 9,62%, arena total 23,18%, limo grueso 6,27%, limo fino 32,37%, limo total 38,64%, arcilla 38,18%, siendo por tanto un suelo franco-arcilloso, carbono (C): 4.48%, nitrógeno (N): 1,32%, C/N: 3,39, pH: 7,09.

El material capturado ha quedado depositado en la criocolección de Oligoquetos del Departamento de Zoología y Antropología Física de la Universidad Complutense de Madrid. El holotipo lleva la clave SAN11, y los paratipos números entre el 1 y 22.

Las técnicas moleculares aplicadas y los análisis filogenéticos efectuados pueden verse en el capítulo VI de esta memoria. Los marcadores moleculares incluyeron regiones mitocondriales de la subunidad I del gen citocromo c oxidasa (COI), y de los genes 16S y tRNA Leu, Ala, y Ser, dos genes nucleares ribosómicos (18S completo y un fragmento del 28S) y dos genes nucleares codificantes de proteína (histona H3 e histona H4).

Derivatio nominis: El nombre *Hormogaster abbatissae* deriva del latín abbatissa que significa abadesa, ya que la especie está dedicada a la abadesa Emma, que fue la primera en el cargo en el Monasterio de monjas de Sant Joan de les Abadesses fundado

en el año 885 por su padre el Conde de Barcelona Wifredo el Velloso, y que perduró hasta el 1017 en que las monjas fueron sustituidas por monjes.

### **VIII.3. Resultados**

#### **VIII.3.1. Descripción**

##### **VIII.3.1.a. Morfología externa (Figura VIII.2)**

Longitud de los ejemplares maduros: 103-130 mm. Diámetros máximos (preclitelar, clitelar, postclitelar): 8, 11, 9 mm. Número de segmentos 239-270. Peso (ejemplares fijados): 3,45-4,98 g.

Color: En vivo la parte anterior es rosa cárneo con el clitelo más fuerte, y la parte posterior es gris-azulada (Figura VIII.1.B). Los ejemplares fijados son gris azulado blanquecino con clitelo beige (Figura VIII.1.D).

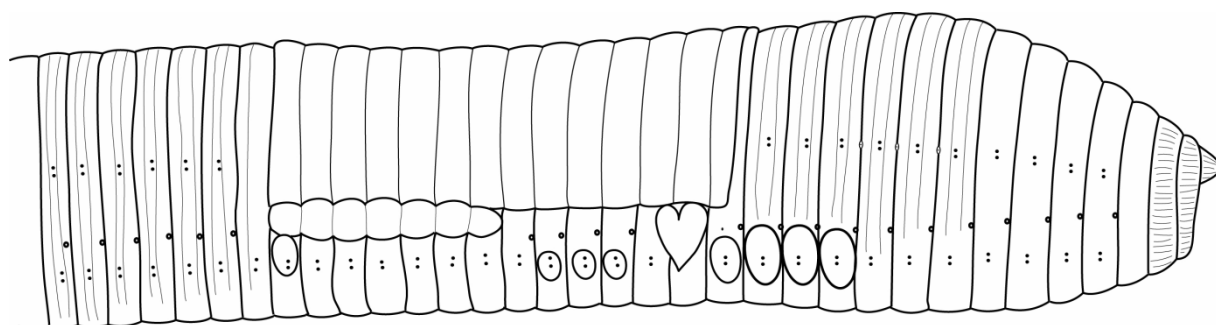
Prostomio proepilóbico 1/3. Quetas estrechamente pareadas, bastante laterales, marcadas en el cuerpo por dos líneas azules tenues; distancias entre quetas en el segmento 50, *aa*: 50, *ab*: 1.5, *bc*: 9, *cd*: 1, *dd*: 52. Poros nefridianos en hilera, entre las hileras de quetas *b* y *c*. Poros de las espermatecas en los intersegmentos 8/9, 9/10 y 10/11, simples y a la altura de las quetas *cd*.

Poros masculinos cerca del surco 15/16 en forma de hendiduras alargadas a la altura de *ab*, con poróforos cordiformes de desarrollo variable que en los ejemplares más maduros pueden ocupar prácticamente todo el ancho del segmento 15 y ½ del 16. Poros femeninos en 14 más o menos a la altura de los masculinos.

Clitelo en forma de silla en 14,15-27. Tubérculos pubertarios en (20) 21,22-26,27 siendo lo más frecuente que aparezcan como una línea continua en 21-27. Papilas variables, son frecuentes en las quetas *ab* en el segmento 27, y más variables en otros segmentos de la zona preclitelar y clitelar.



**Figura VIII.1.** Zona de muestreo de *H. abbatissae* (A), ejemplar vivo (B), ejemplares fijados (D) y detalle de sus espermatecas (C) numeradas de anterior a posterior.



**Figura VIII.2.** Representación de la morfología externa de *H. abbatissae*

### VIII.3.1.b. Anatomía interna

Septos 7/8, 8/9 y 9/10 infundibuliformes y muy engrosados, 6/7 y 10/11 también, pero algo menos. Último par de corazones en 11. Tres mollejas muy muscularizadas en 6, 7 y 8. Las glándulas de Morren no son aparentes; en secciones transversales del esófago en los segmentos 10 a 14 se observan algunos vasos sanguíneos engrosados, pero nunca las laminillas características de estas glándulas.

No hay una molleja posterior bien diferenciada, aunque en 15-16 el esófago está un poco dilatado, pero su pared no está especialmente muscularizada, y su luz no presenta un refuerzo similar al de las mollejas anteriores. En los segmentos 17-25, 26 el tubo digestivo presenta las paredes plegadas en cada segmento, formando lo que en algunas lombrices de tierra se ha llamado estómago. El tiflosol se inicia en 20, 21 y presenta 15 láminas, aunque las dos laterales son muy pequeñas y pueden resultar inadvertidas; el número de láminas disminuye gradualmente, es de sólo tres aproximadamente en el segmento 80, se mantiene trifido hasta el 140-150, simple hasta el 160-170 y hay alrededor de 70-100 segmentos sin tiflosol.

Testículos con aspecto desflecado y embudos masculinos iridiscentes en 10 y 11. Dos pares de vesículas seminales en 11 y 12, con aspecto granuloso y frecuentemente con cuerpos negros en su interior. Ovarios y embudos femeninos en 13, ovisacos grandes en 14.

Tres pares de espermatecas en los segmentos 8, 9 y 10 pegadas a los septos 8/9, 9/10 y 10/11, siendo más pequeñas las de 8. Las espermatecas son como sacos aplanados, tipo plato o platillo volante con bordes irregulares embutidos en la pared corporal por debajo de algunos fascículos musculares. Internamente pueden estar divididas en lóbulos interconectados pero realmente no representan varias espermatecas independientes, sino espermatecas simples plurilobuladas que abren al exterior por un único poro.

Los nefridios anteriores presentan una vejiga en forma de V con las ramas muy abiertas y una rama más corta. Hacia la parte posterior del cuerpo se aplanan tanto que toman aspecto de salchicha alargada.

En algunos ejemplares las quetas sexuales de las papilas en 11 y 12 presentan folículos muy desarrollados que hacen saliente al interior del cuerpo y en los que aparecen simultáneamente varias quetas.

### VIII.3.1.c. Caracteres moleculares

Se han estudiado las secuencias de los genes COI (8 ejemplares), 16S-tRNA (8 ej.), H3 (4 ej.), H4 (4 ej.), 28S (2 ej.) y 18S (1 ej.) que se analizaron en el capítulo VI de esta memoria junto a las secuencias de las restantes especies de hormogástridos recogidas. En el caso de la nueva especie, *H. abbatissae*, los resultados filogenéticos son altamente estables, y siempre la sitúan muy próxima a *H. sylvestris*, especie descrita en la localidad cercana de Montmajor (Barcelona), luego a *H. gallica* de Banyuls-sur-Mer (sur de Francia), *H. catalaunensis* de El Brull (Barcelona) y *H. nigra* de Quillan (sur de Francia), formando generalmente un clado con los *Hormogaster* del nordeste peninsular agrupados en el capítulo VI con *H. huescana* y especies afines.

Las divergencias genéticas entre las especies del género son bastante elevadas. Con todos los genes estudiados la especie más próxima es siempre la misma, *H. sylvestris* con la que en el caso del gen COI presenta una divergencia del 12,67%, siendo todas las demás superiores al 15,64%. Los valores de divergencia con las especies más próximas morfológicamente son altos, presentando así un 18,48% con *H. gallica*, un 18,02% con *H. ireguana*, un 20,45% con *H. riojana* y un 21,42% con *H. najaformis*. De la misma manera la divergencia de *H. abbatissae* con *H. sylvestris* calculada en el fragmento génico 16S-tRNA es de 4,07% y todas las demás son superiores al 10,15%, y lo mismo sucede con los otros genes.

## VIII.4. Discusión

Morfológicamente la mayor parte de especies del género *Hormogaster* son bastante parecidas y los caracteres morfológicos taxonómicos más importantes son el clítel, los tubérculos pubertarios, las espermatecas y el tiflosol, a los que pueden unirse otros como longitud, color y algunos más.



En la Tabla VIII.1 se muestran comparativamente los caracteres de la nueva especie y de las especies más similares.

La especies más parecidas son *H. riojana* de la que se puede diferenciar por el color del cuerpo y del clitelo, la forma de los tubérculos pubertarios y el número de espermatecas (aunque excepcionalmente algún ejemplar de *H. riojana* ha presentado tres pares de espermatecas) y *H. sylvestris* distinguible por la longitud, peso y número de segmentos (*H. sylvestris* es mayor, mucho más pesada y con más segmentos), color, tubérculos pubertarios, espermatecas y tiflosol. De todos estos caracteres, quizás el más específico sea el número de espermatecas, tres pares en *H. abbatissae*.

Algunos caracteres como la presencia de glándulas de Morren o la postmolleja pueden ser muy conflictivos y difíciles de interpretar. Las glándulas de Morren parecen estar claramente ausentes, porque aunque se detecta un enriquecimiento de vasos sanguíneos en la pared esofágica en algunos segmentos entre el 10 y el 14, nunca hemos podido apreciar la existencia de las laminillas que definen este órgano. Algo parecido existe con la postmolleja, ya que en los segmentos 15 a 19 el tubo digestivo de algunas especies puede parecer algo engrosado, pero en *H. abbatissae* nunca se desarrolla una musculatura tan potente como la de una molleja, ni el revestimiento de la luz se engrosa y endurece como en las auténticas mollejas de las lombrices de tierra.

Respecto a los caracteres moleculares, se ha descrito en el capítulo V la presencia de especies crípticas en *G. elisae*, separadas por divergencias genéticas entre el 9,41 y el 18,31% y Herbert *et al.* (2003) dan divergencias con el COI que varían entre el 11,3% entre especies congénicas de varios animales y el 15,7% entre algunas especies de anélidos.

En este sentido la divergencia del 20,45% en el gen COI con *H. riojana* y las diferencias en los demás genes, están muy por encima de la distancia habitual entre especies, y como además existen diferencias morfológicas aunque no sean muy marcadas, parece que estas dos especies pueden separarse bien. En cualquier caso hay que remarcar la coincidencia del clitelo y tubérculos pubertarios que, una vez más, hacen patente la dificultad para separar algunas especies de lombrices utilizando sólo caracteres anatómicos.

	<i>H. abbatissae</i>	<i>H. gallica</i>	<i>H. riojana</i>	<i>H. sylvestris</i>	<i>H. najiformis</i>	<i>H. ireguana</i>
<b>Color</b>	Gris azulado blanquecino	Pardo oscuro (gris pizarra, chocolate negro)	Pardo oscuro	Incolora	Incolora	Pardo grisáceo
<b>Clitelo</b>	14, 15-27 (28) En silla, beige	(13) 14-28 (29,30)	13,14,17-27,28 En silla, oscuro	15-28 En anillo	13-31 En anillo	13-27
<b>Tubérculos pubertarios</b>	(20) 21,22-26,27 Banda ancha	(22, 23) 24 - 27	(20)21-27 Banda fina	22-27	20-26	19-26
<b>Fórmula quetal</b>	50:1,5:9:1:52	69:1,3:8,8:1:66	55:1:13:1:65	50:2:10:1:50	70:1:10:1:80	120:1:20:1:100
<b>Longitud (maduros)</b>	103-130	165-190	125-185	180-220	188-230	100
<b>N. segmentos</b>	239-270	250-433*	243-278	350-420	395-523	223
<b>Peso (g)</b>	3,45-4,98	9,2-17		13,6-15,3		
<b>Espermatecas (poros)</b>	8,9,10 (8/9,9/10,10/11)	9, 10 (9/10,10/11)	9, 10 (9/10,10/11)	9, 10 (9/10,10/11)	9, 10 (9/10,10/11)	8, 9, 10 (8/9,9/10,10/11)
<b>Aspecto</b>	Multiloculares	Múltiples, sésiles, en anillo	Multiloculares	Simples, racemiformes	Múltiples	Simples
<b>Láminas tiflosol</b>	15 (2 muy pequeñas)	13	15	13	15	19
<b>Glándulas de Morren</b>	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Ausentes
<b>Molleja posterior</b>	15? 16 17? Muy débil	14-16? Débil	15-16 Débil	16 Débil	16-17 Débil	14-15 Débil
<b>Otros caracteres</b>		Segmentos anteriores muy carenados				

**Tabla VIII.1.** Comparación de los caracteres morfológicos de *H. abbatissae* con aquellos de las especies más cercanas. N. segmentos: número de segmentos.

La divergencia genética del 12,67% entre *H. abbatissae* y *H. sylvestris* calculada con el gen COI está en el límite entre los valores que podrían llevarnos a considerarlas como la misma o diferentes especies, por lo que las alternativas serían crear una subespecie dentro de *H. sylvestris* o una especie diferente. En cualquier caso la divergencia genética entre estas dos especies no es excesivamente alta para los estándares de este género, y nos indicaría que la especiación no ha debido ser comparativamente muy antigua. Hay que tener en cuenta además que ambas especies

salen siempre juntas formando un clado en todos los árboles filogenéticos, por lo que la decisión no es fácil.

Vistos los caracteres morfológicos, la filogenia del grupo y de las especies próximas, y las divergencias genéticas hemos optado por establecer una nueva especie, ya que según la morfología la especie más próxima sería *H. riojana* de la que se puede separar por los caracteres arriba indicados. También está próxima *H. sylvestris*, pero la separación morfológica parece más robusta. Por el contrario la filogenia y las divergencias genéticas indican que *H. abbatissae* está bastante próxima a *H. sylvestris* y muy separada de *H. riojana* por lo que será necesario realizar nuevos muestreos en esta zona de la provincia de Gerona para ver si existe variabilidad y ambas especies se superponen, o si por el contrario están perfectamente separadas.

## **IX. Discusión y conclusiones/Conclusions**



## IX. Discusión y conclusiones

A lo largo de los diferentes capítulos de esta memoria se han hecho distintas aproximaciones a la biología, filogeografía y filogenia de los hormogástridos, basando estos estudios sobre todo, en los resultados obtenidos mediante herramientas moleculares.

Lo primero que ha quedado patente es que la diversidad genética de estas lombrices de tierra es superior a la esperada. Se han encontrado valores muy altos tanto en los capítulos dedicados al estudio de distintas poblaciones de *Hormogaster elisae* (propuesta como *Gatodrilus elisae*, capítulos IV y V) como en el estudio de la Familia completa (capítulo VI). Debido a que el nombre del nuevo género no será oficial hasta que sea publicado, se seguirá hablando de *Hormogaster elisae* a lo largo de esta discusión y las conclusiones, para así evitar confusión con los capítulos iniciales.

Parece que la evolución molecular ha alcanzado velocidades más rápidas que la evolución morfológica, y es posible que los procesos de especiación críptica sean comunes en esta Familia, como se ha observado en el caso de *H. elisae* (capítulo V) y como apuntan las poblaciones de *Hormogaster redii* en Cerdeña y que será necesario estudiar con mayor detenimiento en un futuro. ¿Qué significado puede tener esto? El medio tan uniforme en el que viven las lombrices de tierra probablemente sea la causa de que las adaptaciones morfológicas que ya se han alcanzado se mantengan. Esto se magnifica teniendo en cuenta que concretamente las lombrices objeto de este estudio viven en suelos “difíciles”, es decir, pobres en materia orgánica y con bajo contenido de humedad, y por tanto las adaptaciones que han desarrollado a este ambiente probablemente ya sean las óptimas, y cualquier cambio sea inadaptativo. Además, como se ha comentado previamente en esta memoria, en un medio tan críptico y en animales donde la presencia o modificación de caracteres sexuales no es importante desde el punto de vista visual, es más plausible que la bioquímica juegue un papel más definitorio.

Estas divergencias genéticas tan altas, por tanto, podrían responder a cambios bioquímicos de las lombrices, no detectables desde el punto de vista morfológico. En esta memoria se ha observado una ligera relación de las divergencias genéticas con los

factores del suelo (capítulos V y VI), pero los resultados no son lo suficientemente robustos como para afirmar que son las características del suelo el único elemento que causa estas grandes divergencias.

Los resultados del capítulo III quizás ayudan a dar interpretación a esta separación tan marcada, tomando como modelo las poblaciones de *H. elisae*. Se ha observado que a pesar de la ausencia de estructuración genética a nivel microgeográfico, sí que hay un patrón de aislamiento por distancia y por tanto el movimiento de estas lombrices es limitado. Esta escasa capacidad de movimiento, que ya se detecta a este nivel de pequeña escala, provoca la evolución separada de los distintos núcleos de *H. elisae*, explicándose así perfectamente, la ausencia de flujo génico incluso entre las poblaciones más cercanas (capítulos IV y V) y por tanto su diversificación hasta el nivel de especies crípticas. Los resultados del estudio exploratorio del capítulo II, en el que se intentaban amplificar los marcadores microsatélites diseñados para la población de El Molar, en individuos de otras poblaciones, cobran ahora todo su sentido. Estos marcadores no amplificaban bien en todas las poblaciones exploradas, lo que después de la realización de esta memoria completa, se puede explicar debido a la especiación críptica en *H. elisae*. Se sabe que los microsatélites son marcadores bastante específicos y muchas veces dan problemas para ser utilizados en especies próximas. Además, para este complejo de especies, se ha detectado una tasa de mutación para el gen COI bastante más elevada que en el resto de clados de hormogástridos (capítulo VI), lo que indica que por alguna razón, en esta zona centro de la Península Ibérica se está produciendo una diversificación mucho más rápida. Sería interesante estudiar las posibles causas.

A lo largo de esta memoria, ha quedado demostrada también la labilidad de los caracteres morfológicos en lombrices de tierra y concretamente en hormogástridos. En primer lugar, por la ya comentada especiación críptica, estos caracteres en muchas ocasiones no son útiles para distinguir especies, y como se ha visto en los árboles generales (capítulo VI), a veces se distribuyen de forma aleatoria en los árboles filogenéticos, lo que oscurece mucho su utilidad taxonómica. Los caracteres moleculares han sido de gran ayuda para complementar a la taxonomía clásica y se ha demostrado la necesidad de la utilización de marcadores que presenten variación a diferentes niveles. En función de las relaciones que se quieran desentrañar, la utilidad de

los marcadores varía y se ha observado que los marcadores mitocondriales son útiles a niveles de especie y población, mientras que son necesarios caracteres nucleares de distinto rango de variación para establecer relaciones a niveles más superiores.

A pesar de todo, la filogenia de los hormogástridos (capítulos VI y VII) todavía deja muchas incógnitas y es necesario ahondar más en este problema en un futuro. Es probable que falten muchas formas intermedias que no se han podido recoger, que nadie ha encontrado nunca o que se han extinguido por alguna razón. Serán necesarios futuros muestreos de la zona potencial de su distribución, que ha sido muestrada de forma parcheada hasta el momento.

La Familia ha resultado ser muy antigua, lo que deja vía libre a la posibilidad de múltiples extinciones a lo largo de toda su historia. Además, focalizando en el caso concreto de *H. elisae*, quizás se podría justificar una extinción “fácil” de estas lombrices de tierra. En la población de El Molar la diversidad genética parecía alta, sin embargo se encontró un ligerísimo grado de endogamia (capítulo III), que quizás con el tiempo podría ser más acusado y provocar el descenso de los niveles de diversidad. La escasa movilidad de estas lombrices hace difícil entender cómo es posible el mantenimiento de esta gran diversidad que se ha encontrado y hace pensar que con el tiempo, los niveles de endogamia irán aumentando, incrementando así las posibilidades de extinción.

No se ha encontrado un patrón de selección sexual muy complicado en *H. elisae*, ya que a pesar de la abundancia de individuos en la parcela estudiada, la escasa capacidad de dispersión limita mucho las posibilidades. Los individuos eligen compañeros de tamaño similar al suyo y la cópula con distintas parejas se puede explicar por la necesidad de acumular esperma para épocas en las que otros compañeros no estén disponibles, más que para una selección del mismo dentro de las espermatecas. Sin embargo, aunque el esperma de distintos compañeros de cópula esté mezclado en las cuatro espermatecas, cabría la posibilidad de que exista una estratificación del esperma en las espermatecas tubulares, algo que sería necesario estudiar en el futuro. De hecho, ya estamos llevando a cabo en nuestro laboratorio un experimento para estudiar la influencia que tiene el orden de cópula en la paternidad de *H. elisae*, pero debido al ciclo tan largo de esta especie, no se ha podido incluir en esta memoria. Esta estratificación, si existiera, podría ser análoga a las espermateceas pluriloculares (con



distintos acúmulos de esperma) que se han observado en otros hormogástridos (véanse como ejemplo las Figuras I.12, VI.3.D, VI.6.A y VI.6.C), y en las que quizás se podría producir una separación del esperma procedente de diferentes parejas. Sería interesante estudiar este problema en alguna otra especie de hormogástrido, ya que su biología sigue siendo desconocida, exceptuando la de *H. elisae*, con la que nuestro grupo ha estado investigando en los últimos años. Esto, nos podría ayudar a entender un poco mejor el significado evolutivo de los diferentes tipos de espermatecas, y así contextualizarlo en la filogenia de la Familia.

Con todo, las principales conclusiones que se pueden extraer de esta memoria son las siguientes:

**1) Estudio microgeográfico y selección sexual de *Hormogaster elisae* en El Molar (capítulos II y III)**

CAPÍTULO II

1. Se han identificado y caracterizado diez regiones microsatélite y se han diseñado cebadores para su amplificación a partir de una librería genómica de la lombriz de tierra *H. elisae*.

2. Los loci microsatélites identificados revelaron altos niveles de diversidad genética, mostrando entre 8 y 25 alelos por locus y altos niveles de heterocigosis, lo que prueba su validez para análisis de paternidad y selección sexual.

3. Los marcadores desarrollados tienen el grado de polimorfismo y fiabilidad requerido para realizar análisis en la población de El Molar. Serían necesarios más esfuerzos en el futuro para poder utilizarlos con éxito en otras poblaciones de *H. elisae*.

CAPÍTULO III

4. La mayoría de los individuos de *H. elisae* almacenan en sus espermatecas el esperma de un mínimo de dos parejas, si bien también se encontraron individuos que guardaban

el espermatozoides de uno o tres individuos, aunque esto podría representar sólo su historia de apareamiento más reciente.

5. Se ha observado que los individuos de *H. elisae* prefieren copular con parejas de tamaño similar al suyo, y que el grado de heterocigosis y el tamaño no se encuentran relacionados con el éxito de apareamiento de los individuos de esta especie.

6. No existe un almacenamiento diferencial del espermatozoides proveniente de diferentes parejas entre las distintas espermatecas, y las cuatro son utilizadas como reservorio del espermatozoides de todas las cópulas por igual, mezclándose así el espermatozoides proveniente de diferentes parejas.

7. No existe una estructuración genética de los individuos de *H. elisae* en la parcela estudiada de El Molar, pero un ligero patrón de aislamiento por distancia sugiere que los individuos de esta especie no se mueven grandes distancias para encontrar un compañero de cópula.

## **2) Filogeografía de *Hormogaster elisae* y especiación críptica (capítulos IV y V)**

### CAPÍTULO IV

8. Todos los individuos de la Familia Hormogastridae capturados en el centro de la Península Ibérica pertenecen a la especie nominal *Hormogaster elisae* por la constancia en una serie de caracteres propios que separan esta especie del resto de las especies del género *Hormogaster*. Sólo se encontraron diferencias en la longitud de los individuos.

9. La diversidad genética observada en el gen COI para *H. elisae* es muy alta y la divergencia genética entre las siete localidades analizadas en el estudio preliminar supera los valores esperados para poblaciones pertenecientes a una misma especie.

10. Se observa una fuerte estructuración de las poblaciones de *H. elisae*, con ausencia de flujo génico entre ellas, cuya causa fundamental podría ser un patrón de aislamiento por distancia.

11. Entre las siete poblaciones analizadas en el estudio preliminar hay seis linajes evolutivos independientes, agrupándose las poblaciones de El Molar y Redueña. Los linajes de Sevilla la Nueva y El Pardo aparecen en el árbol filogenético como un grupo separado del resto de linajes.

12. Los linajes de Molar-Redueña y Lozoyuela parecen estar en equilibrio demográfico mientras que los linajes de Anchuelo, El Pardo, Sevilla la Nueva y Sigüero probablemente sufrieran una expansión repentina hace pocos miles de años.

## CAPÍTULO V

13. Con el estudio de un mayor número de poblaciones de *H. elisae* se confirman los altos valores de diversidad genética y las marcadas divergencias entre poblaciones, que corroboradas por datos mitocondriales y nucleares confirman la presencia de especies crípticas dentro del área estudiada.

14. Los resultados sugieren un único evento de colonización de los hormogástridos en el centro de la Península Ibérica que ha llevado a una constancia morfológica de los especímenes y a una alta diversidad genética. Entre las poblaciones analizadas hay nueve linajes evolutivos independientes.

15. Los genes mitocondriales y nucleares coincidieron al indicar la presencia de al menos cinco especies crípticas alopátricas dentro del complejo de *H. elisae* en el centro de la Península Ibérica. La especie críptica 1 mostró una divergencia intra-específica alta que debería ser estudiada en un futuro para dilucidar el nivel de biodiversidad real que ésta contiene.

16. Un patrón de aislamiento por distancia sugiere que la distribución actual del linaje de *H. elisae* podría haber surgido por una colonización progresiva en el pasado y una fragmentación de las poblaciones a lo largo de mucho tiempo, debido a la escasa capacidad de dispersión de las lombrices de tierra endógenas. Una correlación positiva entre algunas propiedades del suelo y las distancias genéticas, sugiere que estas poblaciones han sido modeladas genéticamente, pero no morfológicamente, por el ambiente.

17. No se ha encontrado relación entre las variaciones de tamaño encontradas entre los individuos de *H. elisae* y los factores del suelo estudiados o la variabilidad genética.

### **3) Filogenia molecular de Hormogastridae (capítulos VI, VII y VIII)**

#### CAPÍTULO VI

18. Los valores de diversidad genética de Hormogastridae resultaron muy altos y similares a los que presentan las especies de esta Familia con los lumbrícidos.

19. El género *Hormogaster* es polifilético y también lo es *Hormogaster pretiosa*, lo que implica la necesidad de una revisión taxonómica. *Vignysa* podría ser la forma ancestral de la Familia, aunque las relaciones entre géneros no están muy claras. *Hemigastrodrilus* parece estar relacionado con el complejo de *H. elisae*, que representa un linaje evolutivo con una alta diversidad genética y que proponemos como un nuevo género dentro de los Hormogastridae. Córcega y Cerdeña parecen haber recibido dos influencias genéticas diferentes. Las especies localizadas en Córcega y en el norte de Cerdeña parecen estar más relacionadas con *Vignysa*, mientras *H. pretiosa*, en el sur de Cerdeña, está más relacionada con algunas especies de *Hormogaster* del nordeste de España, donde hay dos linajes diferentes.

20. La diversificación de los Hormogastridae parece ser muy antigua, comenzando hace unos 97-75 millones de años.

21. La tasa de sustitución del COI calculada para los hormogástridos resultó ser muy variable y específica de clado, con valores desde 0,6% a 2,9% sustituciones por posición y millón de años. El linaje del complejo de *H. elisae* está sufriendo una diversificación mucho más rápida, ya que la tasa de sustitución del COI en este clado es mucho mayor comparada con aquella que presentan el resto de especies de *Hormogaster*.

22. Todos los factores del suelo, excepto el porcentaje de arena fina, presentan correlaciones significativas con alguno de los fragmentos génicos analizados, pero los coeficientes de correlación no son lo suficientemente altos como para sacar conclusiones. Por lo general, los hormogástridos se concentran en suelos pobres, con

poca materia orgánica y bajo contenido en nitrógeno. *H. elisae* tiene una tendencia hacia las zonas con mayor contenido en arena gruesa, más ácidas y un poco más pobres, mientras que los *Hormogaster* del nordeste de la Península se encuentran en zonas de textura más fina y mayor pH. *Xana* se encuentra en los suelos más arcillosos y el resto de clados se distribuyen en suelos heterogéneos.

## CAPÍTULO VII

23. Se proponen algunos cambios para la taxonomía de los Hormogastridae. Entre ellos, la creación de un nuevo género, *Gatodrilus*, para el linaje de la que hasta ahora se ha denominado *Hormogaster elisae*, el aumento a rango de especie a *H. redii insularis* (*H. insularis*) y *H. pretiosa nigra* (*H. nigra*) y el cambio a rango de subespecie *H. oroeli* (*H. pretiosiformis oroeli*). Asimismo se limita el nombre de *H. pretiosa* al sur de Cerdeña, donde esta especie fue descrita inicialmente.

## CAPÍTULO VIII

24. Los ejemplares recogidos en Sant Joan de les Abadesses (Gerona, España) representan una especie nueva para la ciencia, que se ha denominado *Hormogaster abbatissae*.

## IX. Conclusions

### 1) Microgeographical study and sexual selection of *Hormogaster elisae* in El Molar (chapters II and III)

#### CHAPTER II

1. Ten microsatellite markers were developed and characterised from an SSR-enriched genomic DNA library of the earthworm *Hormogaster elisae*.
2. The identified microsatellite loci revealed high levels of genetic diversity, 8 to 25 alleles per locus and high levels of heterozygosity, which proves their suitability for paternity analysis and sexual selection studies.
3. The developed markers exhibit the polymorphism and reliability to conduct analyses in El Molar population. Further optimization efforts would be needed in the future to achieve their successful use in other populations of *H. elisae*.

#### CHAPTER III

4. Most of the individuals of *H. elisae* store in their spermathecae the sperm of a minimum of two partners, although some individuals were found that stored the sperm from one or three partners. However, this could be representing only their most recent mating history.
5. Individuals of *H. elisae* would rather copulate with similar sized partners and neither the heterozygosity degree nor the size are related to their mating success.
6. There is no differential storage of the sperm from different partners in the four spermathecae being the sperm from the different copulations mixed.
7. No genetic structure of *H. elisae* was found in the studied plot in El Molar but a slight isolation by distance pattern suggests that the individuals do not move long distances to find a mating partner.

## 2) Phylogeography and cryptic speciation of *Hormogaster elisae* (chapters IV and V)

### CHAPTER IV

8. All the hormogastrids collected in the central area of the Iberian Peninsula belonged to the nominal species *H. elisae* because of the constancy of a series of unique characters that separate this species from the remaining species of the *Hormogaster* genus. Only length differences were found among the individuals from different populations.

9. Genetic diversity based on COI gene was very high for *H. elisae* and the genetic divergence among the seven populations included in the preliminary study exceeded the expected values for populations belonging to the same species.

10. A great genetic structure, with no gene flow, was observed in the populations of *H. elisae*, and the main cause could be a pattern of isolation by distance.

11. Six independent evolutionary lineages were recovered from the seven populations included in the preliminary study, being El Molar and Redueña grouped together. The lineages from Sevilla la Nueva and El Pardo appear in the phylogenetic tree as a separated group from the remaining lineages.

12. The lineages from El Molar-Redueña and Lozoyuela seem to be in demographic equilibrium whereas the lineages from Anchuelo, El Pardo, Sevilla la Nueva and Siguero probably were subject to a sudden expansion process a few thousand years ago.

### CHAPTER V

13. The study of a larger number of populations of *H. elisae* reaffirmed the high genetic diversity and the accentuated divergence values among populations, which were corroborated by mitochondrial and nuclear data, and confirmed the presence of cryptic species within the studied area.

14. The results suggest a single colonization event of hormogastrids in the central area of the Iberian Peninsula, which has lead to a morphological constancy of the specimens and to a high genetic diversity. Within the studied populations, nine independent evolutionary lineages were detected.

15. The mitochondrial and nuclear genes agreed to indicate the presence of at least five cryptic allopatric species within the complex of *H. elisae* in the central area of the Iberian Peninsula. The cryptic species 1 showed a high intraspecific divergence that should be studied in the future to unravel the true level of biodiversity that it contains.

16. A pattern of isolation by distance suggested that the current distribution of the lineage of *H. elisae* could have been a result of a diffusive spread colonization in the past and a high fragmentation of populations over a long period of time, due to the scarce dispersal capacity of endogeic earthworms. A positive correlation was found between some soil properties (coarse sand and total loam content) and genetic distances, which indicate that these populations have been shaped genetically, but not morphologically, by the environment.

17. No correlation was found between the size differences among individuals of *H. elisae* and the studied soil factors or the genetic variability.

### **3) Molecular phylogeny of Hormogastridae (chapters VI, VII and VIII)**

#### CHAPTER VI

18. The genetic diversity values were very high within hormogastrids and similar to the ones presented by the species of this Family with lumbricids.

19. The genus *Hormogaster* is polyphyletic and so is *Hormogaster pretiosa*, stressing the need of a taxonomic revision. *Vignysa* could be the ancestral form of the family, although the relations among genera are not clearly defined. *Hemigastrodrilus* seems to be related to the *H. elisae* complex, which represents one evolutionary lineage with a high genetic diversity that we propose as a new genus within Hormogastridae. Corsica and Sardinia seem to have been under two different genetic influences. The species



located in Corsica and Northern Sardinia seem to be more related to *Vignysa*, whereas *H. pretiosa* in the Southern area of Sardinia, is more closely related to some *Hormogaster* species from Northeastern Spain, where two different lineages are present.

20. The diversification of *Hormogastridae* may be very ancient, starting from 97 to 75 MY ago.

21. The substitution rate of COI gene calculated in hormogastrids resulted to be very variable and clade-specific, showing values from 0,6% to 2,9% substitutions per site and MY. The lineage of *H. elisae* complex is under a much quicker diversification as showed by the higher rate of substitution of COI gene.

22. Every soil factor measured, except for the percentage of fine sand, presented significative correlations with some of the analysed gene fragments but the correlation coefficients were not high enough to state any conclusion. In general, hormogastrids concentrate in poor soils, with low content of organic matter and nitrogen. *H. elisae* tends to live in areas with more content in coarse sand, more acid and a little bit poorer, whereas *Hormogaster* species from the Northeastern Iberian Peninsula are found in soils with finer texture and higher pH. *Xana* is found in soils with more content of clay and the remainder clades are distributed in more heterogeneous soils.

## CHAPTER VII

23. Some changes in the taxonomy of *Hormogastridae* earthworms are proposed. Among them, the creation of a new genus, *Gatodrilus*, for the lineage that had been named until now as *Hormogaster elisae*, the raise of *H. redii insularis* and *H. pretiosa nigra* to species level (*H. insularis* and *H. nigra* now) and the degradation of *H. oroeli* to the subspecies level (*H. pretiosiformis oroeli*). Moreover, the name *H. pretiosa* is limited to the South of Sardinia, where it was initially described.

## CHAPTER VIII

24. The specimens collected in Sant Joan de les Abadesses (Gerona, Spain) represent a new species for the science, which has been nominated *Hormogaster abbatissae*.

## **X. Bibliografia**



## X. Bibliografía

- Adkins RM, Honeycutt RL, Disotell TR (1996) Evolution of Eutherian Cytochrome c Oxidase Subunit II: Heterogeneous Rates of Protein Evolution and Altered Interaction with Cytochrome c. *Molecular Biology and Evolution* 13: 1393-1404.
- Akaike H (1973) Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. En: Petrov BN, Csaki F, (Eds.) Second International Symposium on Information Theory. Budapest (Hungary). Akademiai Kiado, pp. 267-281.
- Akane A, Shiono H, Matsubara K, Nakamura H, Hasegawa M, Kagawa M (1993) Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR) analysis. *Journal of Forensic Science* 38: 691-701.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389-3402.
- Álvarez J (1971) Oligoquetos terrícolas ibéricos. Megascólécidos y Glososcólécidos. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 69: 97-114.
- Álvarez J (1977) El género *Hormogaster* en España. *Publicaciones del Centro Pirenaico de Biología Experimental* 9: 27-35.
- Álvarez W (1972) Rotation of the Corsica-Sardinia microplate. *Nature* 235: 103-105.
- Álvarez W (1974) Sardinia and Corsica one microplate or two? Rendiconti Seminari Facoltà di Scienze Università di Cagliari.

- Andeweg B (2002) Cenozoic tectonic evolution of the Iberian Peninsula, causes and effects of changing stress fields. Tesis Doctoral. Vrije Universiteit Amsterdam, Amsterdam, Netherlands, 178 pp.
- Andre F (1963) Contribution a l'analyse experimentale de la reproduction des lombriciens. *Bulletin biologique de la France et de la Belgique* 97: 4-101.
- Anne P (1945) Sur le dosage rapide du carbone organique des sols. *Annales Agronomiques* 2: 162-172.
- Awise JC (1994) Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Chapman and Hall, New York, 513 pp.
- Awise JC (1995) Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology* 9: 686-690.
- Awise JC (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 441 pp.
- Awise JC, Neigel JE, Arnold J (1984) Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations *Journal of Molecular Evolution* 20: 99-105.
- Bacchetta G, Mandis G, Pontecorvo C (2007) Contribution to the knowledge of the endemic vascular flora of Sulcis (SW Sardinia - Italy). *Boccone* 21: 155-166.
- Barley KP (1958) The influence of earthworms on soil fertility. II. Consumption of soil organic matter by the earthworm *Allolobophora caliginosa* (Savigny). *Australian Journal of Agricultural Research* 10: 179-185.
- Barrett RDH, Hebert PDN (2005) Identifying spiders through DNA barcodes. *Canadian Journal of Zoology* 83: 481-491.

- Barros F, Carracedo F, Díaz Cosín DJ (1992) Karyological and allozymic study of *Allolobophora molleri* and several related taxa. *Soil Biology and Biochemistry* 24 (12): 1242-1255.
- Bateman AJ (1948) Intra-sexual selection in *Drosophila*. *Journal of Heredity* 2: 349-368.
- Bely AE, Weisblat DA (2006) Lessons from leeches: a call for DNA barcoding in the lab. *Evolution and Development* 8: 491-501.
- Bely AE, Wray GA (2004) Molecular phylogeny of naidid worms (Annelida: Clitellata) based on cytochrome oxidase I. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 50-63.
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PK, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22, 148-155.
- Birkhead TR, Pizzari T (2002) Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics* 3: 262-273.
- Black MB, Halanych KM, Maas PAY, Hoeh WR, Hashimoto J, Desbruyeres D, Lutz RA, Vrijenhoek RC (1997) Molecular systematics of vestimentiferan tubeworms from hydrothermal vents and cold-water seeps. *Marine Biology* 130: 141-149.
- Blaxter ML (2004) The promise of a DNA taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 359: 669-679.
- Bleidorn C (2005) Phylogenetic relationships and evolution of Orbiniidae (Annelida, Polychaeta) based on molecular data. *Zoological Journal of the Linnean Society* 144: 59-73.
- Blondel J, Aronson J (1999) Biology and Wildlife of the Mediterranean Region. Oxford University Press, Oxford, 328 pp.

- Bolotetskii NM, Kodolova OP, Pravdukhina OY (1994) Genetic diversity of the earthworm *Eisenia foetida* (Sav.). *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya* 3: 404-410.
- Bolotetskii NM, Kodolova OP, Logvinenko BM (1996) On genetic diversity of the earthworm *Apporectodea caliginosa* (Sav.) (Lumbricidae). *Izvestiya Akademii Nauk, Seriya Biologicheskaya* 1: 112-116.
- Bolotetskii NM, Kodolova OP (2002) Genetic aspects of species structure of the compost worm *Eisenia foetida* (Sav.) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Zhurnal Obshchei Biologii* 63: 15-25.
- Bolotetskii NM, Kodolova OP (2005) Intraspecific genetic and morphological variation in earthworm *Eisenia foetida* (Sav.). *Biology Bulletin* 32: 366-370.
- Boore JL, Brown WM (1995) Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* 141 (1): 305-319.
- Bouché MB (1970) Remarques sur quelques Lumbricina de France et consequences de la decouverte des nouveaux taxons Vignysinae (Subfam. nov) et Diporodrilodae (Fam. nov.). *Pedobiologia* 10: 246-256.
- Bouché MB (1971) Relations entre les structures spatiales et fonctionnelles des ecosystems, illustrées par le role pédobiologique des vers de terre. Le vie dans les sols. Ed. Gauthier-Villars, Paris, pp. 187-209.
- Bouché MB (1972) Lombriciens de France Écologie et Systématique. Institut National de la Reserche Agronomique. *Annales de Zoologie Écologie animale*. Numéro hors série. Paris, 671 pp.
- Bouché MB (1975) La reproduction de *Spermophorodrilus albanianus* nov. Gen., nov. Spec. (Lumbricidae) explique-t-elle la fonction des spermatophores? *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Systematique* 102: 1-11.

- Boyle EE, Zardus JD, Chase MR, Etter RJ, Rex MA (2004) Strategies for molecular genetic studies of preserved deep-sea macrofauna. *Deep-Sea Research I* 51: 1319-1336.
- Briones MJ (1991) Lombrices de tierra de Asturias, León, Zamora y Salamanca. Faunística y Ecología. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, España, 349 pp.
- Briones MJ, Morán P, Posada D (2009) Are the sexual, somatic and genetic characters enough to solve nomenclatural problems in lumbricid taxonomy? *Soil Biology and Biochemistry* 41: 2257-2271.
- Butt KR, Nuutinen V (1998) Reproduction of the earthworm *Lumbricus terrestris* Linné after the first mating. *Canadian Journal of Zoology* 76: 104-109.
- Caccone A, Sbordoni V (2001) Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from bathysciine beetles. *Evolution* 55: 122-130.
- Calendini F, Martin JF (2005) PaupUP v. 1.0.3.1. A free graphical frontend for Paup\* Dos software. Disponible en:  
<http://www.agro-montpellier.fr/sppe/Recherche/JFM/PaupUp/>
- Cameron EK, Bayne EM, Coltman DW (2008) Genetic structure of invasive earthworms *Dendrobaena octaedra* in the boreal forest of Alberta: insights into introduction mechanisms. *Molecular Ecology* 17: 1189-1197.
- Carranza Gil-Dolz del Castellar S (1997) Taxonomia molecular mitjançant la seqüenciació del DNA ribosòmic 18S. Aplicació a l'origen i filogènia dels Plathelminths. Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, España, 273 pp.
- Challis RJ, Mutun S, Nieves-Aldrey JL, Preuss S, Rokas A, Aebi A, Sadeghi E, Tavakoli M, Stone GN (2007) Longitudinal range expansion and cryptic eastern



- species in the western Palaearctic oak gallwasp, *Andricus coriarius*. *Molecular Ecology* 16: 2103-2114.
- Chang CH, Chen JH (2005) Taxonomic status and intraspecific phylogeography of two sibling species of *Metaphire* (Oligochaeta: Megascolecidae) in Taiwan. *Pedobiologia* 49: 591-600.
- Chang CH, Chuang SC, Chen YR, Chen JH (2005) NADH Dehydrogenase Subunit 1 Gene of the Earthworm *Amyntas gracilis* (Kinberg, 1867) (Oligochaeta: Megascolecidae), with the Discussion on Inferring the Megascolecid Phylogeny Using DNA Sequences. *Taiwania* 50 (2): 71-79.
- Chang CH, Lin YH, Chen JH, Chuang SC, Chen JH (2007) Taxonomic re-evaluation of the Taiwanese montane earthworm *Amyntas wulinensis* Tsai, Shen & Tsai, 2001 (Oligochaeta: Megascolecidae): polytypic species or species complex? *Organisms Diversity and Evolution* 7: 231-240.
- Chang CH, Lin SM, Chen JH (2008a) Molecular systematics and phylogeography of the gigantic earthworms of the *Metaphire formosae* species group (Clitellata, Megascolecidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49 (3): 958-968.
- Chang CH, Rougerieb R, Chen JH (2008b) Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia* 51: 301-309.
- Chang CH, Rougerie R, Chen JH (2009) Identifying earthworms through DNA barcodes: Pitfalls and promise. *Pedobiologia* 52 (3): 171-180.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies *Molecular Ecology* 9: 1657-1659.
- Cobolli Sbordoni M, De Matthaeis E, Alonzi A, Mattoccia M, Omodeo P, Rota E (1992) Speciation, genetic divergence and palaeogeography in the Hormogastridae. *Soil Biology and Biochemistry* 24 (12): 1213-1221.

- Cobolli Sbordoni M, De Matthaeis E, Omodeo P, Bidoli R, Rodino E (1987) Allozyme variation and divergence between diploid and triploid populations of *Allolobophora caliginosa* (Lumbricidae, Oligochaeta). En: Bonvicini AM, Omodeo P (Eds.) On Earthworms. Mucchi, Modena, pp. 53-74.
- Cognetti de Martiis L (1914) Escursioni Zoologiche del Dr. Enrico Festa nei monti della Vallata del Sangro (Abruzzo). Nota sugli Oligocheti degli Abruzzi. *Bolletino dei Musei di Zoologia ed Anatomia Comparata della R. Università di Torino*, 689 (XXIX).
- Colgan DJ, Mclauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas J, Cassis G, Gray MR (1998) Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46: 419-437.
- Cooper CE, Nicholls P, Freedman JA (1991) Cytochrome c oxidase: structure, function and membrane topology of the polypeptide subunits. *Biochemistry and Cell Biology* 6: 586-607.
- Crandall KA, Templeton AR (1993) Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- Crandall KA, Templeton, AR, Sing, CF (1994) Intraspecific cladogram estimation: problems and solutions. En: Scotland RW, Siebert DJ, Williams, DM (Eds.) Models in Phylogeny Reconstruction. Clarendon Press, Oxford, pp. 273-297.
- Csuzdi C, Pop AA, Pop VV, Wink M, Zicsi A (2005) Revision of the *Dendrobaena alpina* (Rosa, 1884) species group (Oligochaeta, Lumbricidae) by morphological and molecular methods. En: Pop V.V. and Pop A.A. (Eds.) Advances in Earthworm Taxonomy II, Cluj University Press, Cluj-Napoca, pp. 119-128.
- Darwin C (1838) On the formation of mould. *Proceedings of the Geological Society of London* 2: 574-576.

- Darwin C (1881) The formation of vegetable mould through the actions of worms. John Murray, London, 326 pp.
- Decaëns T, Mariani L, Betancourt N, Jiménez JJ (2003) Seed dispersion by surface casting activity of earthworms in Colombian grasslands. *Acta Oecologica* 24: 175-185.
- DeSalle R, Egan MG, Siddall M (2005) The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B. Biological Sciences* 360: 1905-1916.
- Díaz Cosín, DJ, Briones MJ, Trigo D (1989) Descripción de una nueva especie de lombriz de tierra, *Xana omodeoi* (Hormogastridae, Oligochaeta) y sus implicaciones en la división de los Hormogastridae. *Revue d'Écologie et Biologie du Sol* 26 (2): 225-231.
- Díaz Cosín DJ, Moro RP, Valle JV, Garvín MH, Trigo D, Jesús JB (1996) Producción de heces de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae) en diferentes tipos de cultivos en laboratorio. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 92 (1-4): 177-184.
- Díaz Cosín DJ, Ruiz MP, Garvín MH, Ramajo M, Trigo D (2002) Gut load and transit time in *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in laboratory cultures. *European Journal of Soil Biology* 38: 43-46.
- Díaz Cosín DJ, Ruiz MP, Ramajo M, Gutiérrez M (2006) Is the aestivation of the earthworm *Hormogaster elisae* a paradiapause? *Invertebrate Biology* 125 (3): 250-255.
- Díaz Cosín DJ, Hernández P, Trigo D, Fernández R, Novo M (2009) Algunos aspectos del ciclo biológico del endemismo ibérico, *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae), en cultivos de laboratorio. *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 103 (1-4): 49-57.

- Díaz Cosín DJ, Novo M, Fernández R. En preparación. Variabilidad anatómica de *Hormogaster elisae* en la Región Central de la Península Ibérica.
- Dupont L (2009) Perspectives on the application of molecular genetics to earthworm ecology. *Pedobiologia* 52 (3): 191-206.
- Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A (1996) Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques* 20: 758-760.
- Edwards CA (Ed) (2004) Earthworm Ecology. 2ª edición, CRC Press, London, 441 pp.
- Edwards CA, Bohlen PJ (1996) Biology and Ecology of Earthworms. 3ª edición, Chapman and Hall, Londres, 426 pp.
- Edwards CA, Lofty JR (1972) Biology of earthworms. Chapman and Hall. Londres, 244 pp.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 832-839.
- Enckell PH, Niklasson M, Stille B, Douwes P (1986) Insulation and isolation: factors influencing the genetic variation in *Lumbricus rubellus* Hoffm. (Lumbricidae) in the Faroe Islands. *Hereditas* 104: 263-271.
- Erseus C, Källersjö M, Ekman M, Hovmoller R (2002) 18S rDNA phylogeny of the Tubificidae (Clitellata) and its constituent taxa: dismissal of the Naididae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 414-22.
- Ewens WJ (2000) Mathematical Population Genetics I. Theoretical Introduction. 2ª edición, Springer Verlag, Berlin, 405 pp.

- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Farris JS, Källersjö M, Kluge AG, Bult C (1994) Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315-320.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J (2004) Inferring Phylogenies. Sinauer Associates, Inc. US, 580 pp.
- Field SG, Schirp HJ, Michiels NK (2003) The influence of *Monocystis* sp infection on growth and mating behaviour of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Canadian Journal of Zoology* 81: 1161-1167.
- Field SG, Michiels NK (2005) Parasitism and growth in the earthworm *Lumbricus terrestris*: fitness costs of the gregarine parasite *Monocystis* sp. *Parasitology* 130: 1-7.
- Field SG, Lange M, Schulenburg H, Velavan TP, Michiels NK (2007) Genetic diversity and parasite defense in a fragmented urban metapopulation of earthworms. *Animal Conservation* 10: 162-175.
- Finston TL, Johnson MS, Humphreys WF, Eberhard SM, Halse SA (2007) Cryptic speciation in two widespread subterranean amphipod genera reflects historical drainage patterns in an ancient landscape. *Molecular Ecology* 16: 355-365.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse

metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3 (5): 294- 299.

Garvín MH (1995) Efecto de la lombriz de tierra *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae) sobre la mineralización del carbono y el nitrógeno del suelo en sistemas cerrados. Tesina de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

Garvín MH, Trigo D, Díaz Cosín DJ (1999) Some data on the reproductive biology of *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae) *Pedobiologia* 43: 830-834.

Garvín MH, Lattaud C, Trigo D, Lavelle P (2000) Activity of glycolytic enzymes in the gut of *Hormogaster elisae*, Álvarez, 1977 (Oligochaeta, Hormogastridae). *Soil Biology and Biochemistry* 32: 929-934.

Garvín M, Martínez F, Jesús JB, Gutiérrez G, Ruiz P, Díaz Cosín DJ (2001) Effect of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta; Hormogastridae) on the stability of soil aggregates. *European Journal of Soil Biology* 37: 273-276.

Garvín MH, Trigo D, Hernández P, Ruiz MP, Díaz Cosín DJ (2002) Interactions of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) with other Earthworms Species from Redueña (Madrid, Spain). *Applied Soil Ecology* 20: 163-169.

Garvín MH, Trigo D, Hernández P, Díaz Cosín DJ (2003) Gametogenesis and reproduction in *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae). *Invertebrate Biology* 122 (2): 152-157.

Giribet G (2005) Generating implied alignments under direct optimization using POY. *Cladistics* 21: 396-402.

Giribet G, Edgecombe, GD, Wheeler WC, Babbitt C (2002) Phylogeny and systematic position of Opiliones: a combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics* 18: 5-70.

- Giribet G, Carranza S, Baguña J, Ruitort M, Ribera C (1996) First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Molecular Biology and Evolution* 13: 76-84.
- Goloboff PA (1999) Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.
- Goloboff PA (2002) Techniques for analyzing large data sets. En: Desalle R, Giribet G, Wheeler W (Eds.). *Techniques in molecular systematics and evolution*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 70-79.
- Goloboff PA, Farris JS, Nixon KC (2003) T.N.T: Tree Analysis Using New Technology, version 1.1. Disponible en:  
<http://www.zmuc.dk/public/phylogeny/TNT/>.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponible en:  
<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Grigoropoulou N, Butt KR, Lowe CN (2008) Effects on adult *Lumbricus terrestris* on cocoons and hatchlings in Evans' boxes. *Pedobiologia* 51: 343-349.
- Grove AJ (1925) On the reproductive processes of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 69: 245-290.
- Grove AJ, Cowley LF (1926) On the reproductive processes of the brandling worm, *Eisenia foetida* (Sav.). *Quarterly Journal of Microscopical Science* 70: 559-581.
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52: 696-704.
- Gutián F, Carballas T (1976) Técnicas de análisis de suelos. 2ª edición. Editorial Pico Sacro, Santiago de Compostela, 288 pp.

- Guo S, Thompson E (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Gustafsson DR, Price DA, Erseus C (2009) Genetic variation in the popular lab worm *Lumbriculus variegatus* (Annelida: Clitellata: Lumbriculidae) reveals cryptic speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 51 (2): 182-189.
- Gutiérrez M, Ramajo M, Jesús JB, Díaz Cosín DJ (2003) The effect of *Hormogaster elisae* (Hormogastridae) on the abundance of soil Collembola and Acari in laboratory cultures. *Biology and Fertility of Soils* 37: 231-236.
- Gutiérrez M, Jesús JB, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2006) Is *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) a predator of mite and springtails? *European Journal of Soil Biology* 42: S186-S190.
- Gutiérrez M, Jesús JB, Trigo D, Novo M, Díaz Cosín DJ (2008) Is there food competition between *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) and soil microarthropods at El Molar (Madrid)? *European Journal of Soil Biology* 44: 207-212.
- Gutiérrez M, Jesús JB, Trigo D, Fernández R, Díaz Cosín DJ (2009) The influence of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) on the colonization of defaunated soil by microarthropods in laboratory cultures. *Pedobiologia* 52 (3): 163-170.
- Haimi J, Knott KE, Yliniemi I (2007) Does metal contamination affect clonal diversity of the parthenogenetic earthworm *Dendrobaena octaedra*? *European Journal of Soil Biology* 43: S268-S272.
- Halanych KM, Janosik AM (2006) A review of molecular markers used for Annelid phylogenetics. *Integrative and Comparative Biology* 46: 533-543.



- Hale CM, Frelich LE, Reich PB (2005) Exotic European earthworm invasion dynamics in northern hardwood forest of Minnesota, USA. *Ecological Applications* 15: 848-860.
- Hansen PL, Holmstrup M, Bayley M, Simonsen V (2006) Low genetic variation for *Dendrobaena octaedra* from Greenland compared to populations from Europe and NorthAmerica: refuge or selection? *Pedobiologia* 50: 225-234.
- Harper GL, Cesarini S, Casey SP, Morgan AJ, Kille P, Bruford MW (2006) Microsatellite markers for the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Molecular Ecology Notes* 6: 325-327.
- Harrison RG (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends in Ecology and Evolution* 4: 6-11.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano K (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22: 160-174.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003a). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 270: 313-321.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003b) Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B (Suppl.)* 270: S96-S99.
- Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W (2004a) Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astrartes fuligator*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 101: 14812-14817.
- Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemplak TS, Francis CM (2004b) Identification of birds though DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* 2: 1657-1663.

- Heethoff M, Etzold K, Scheu S (2004) Mitochondrial COII sequences indicate that the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum* (Savigny 1826) constitutes of two lineages differing in body size and genotype. *Pedobiologia* 48: 9-13.
- Hernández P (2005) Estudio de la distribución horizontal de *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) en el Molar y de los factores que la regulan. Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 241 pp.
- Hernández P, Gutiérrez M, Ramajo M, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2003) Horizontal distribution of an earthworm community at El Molar, Madrid (Spain) *Pedobiologia* 47: 568-573.
- Hernández P, Fernández R, Novo M, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2007) Geostatistical and multivariate analysis of the horizontal distribution of an earthworm community in El Molar (Madrid, Spain). *Pedobiologia* 51: 13-21.
- Hewitt GM (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Hogg ID, Stevens MI, Schnabel KE, Chapman MA (2006) Deeply divergent lineages of the widespread New Zealand amphipod *Paracalliope fluviatilis* revealed using allozyme and mitochondrial DNA analyses. *Freshwater Biology* 51: 236-248.
- Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W (1992) Excrement analysis by PCR. *Nature* 359: 199.
- Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Research* 21: 3913-3914.
- Huang J, Xu Q, Jun Sun Z, Lan Tang G, You Su Z (2007) Identifying earthworms through DNA barcodes. *Pedobiologia* 51: 301-309.

- Huntley B, Birks HJB (1983) An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe: 0-13 000 Years Ago. Cambridge University Press, Cambridge, 667 pp.
- Hurtado LA, Lutz RA, Vrijenhoek RC (2004) Distinct patterns of genetic differentiation among annelids of eastern Pacific hydrothermal vents. *Molecular Ecology* 13: 2603-2615.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23: 254-267.
- Jaenike J, Parker Jr ED, Selander RK (1980) Clonal niche structure in the parthenogenetic earthworm *Octolasion tyrtaeum*. *American Naturalist* 116: 196-205.
- Jamieson BGM (1971) Glossoscolecidae. En: Brinkhurst RO, Jamieson BGM (Eds). The aquatic Oligochaeta of the world, Oliver and Boyd, Edinburgh, Toronto, 860 pp.
- Jamieson BGM (1978) On the phylogeny and higher classification of the Oligochaeta. *Cladistics* 4: 367-410.
- Jamieson BGM (1992) Oligochaeta. En: Harrison FW, Gardiner SL (Eds.). Microscopic Anatomy of Invertebrates. Annelida (vol 7). Wiley-Liss, New York, pp. 217-322.
- Jamieson BGM, Tillier S, Tillier A, Justine JL, Ling E, James S, McDonald K, Hugall AF (2002) Phylogeny of the Megascolecidae and Crassicolitellata (Annelida, Oligochaeta): combined versus partitioned analysis using nuclear (28S) and mitochondrial (12S, 16S) rDNA. *Zoosystema*, 24 (4): 707-734.
- Jarne P, Lagoda PJJ (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 424-429.

- Jensen JL, Bohonak AJ, Kelley ST (2005) Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6, 13-18. Disponible en: <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jesús JB, Fernández B, Gutiérrez M (2002) Lombrices de tierra de la Comunidad de Madrid (España). II. Géneros *Eisenia*, *Eiseniella*, *Eiseniona*, *Lumbricus*, *Octodrilus*, *Ostolasion*, *Hormogaster*, *Microscolex*, *Eukerria* y *Ocnerodrilus* (Annelida, Oligochaeta). *Boletín de la Real Sociedad Española de Historia Natural (Sección Biológica)* 97 (1-4): 61-69.
- Jolly MT, Jollivet D, Gentil F, Thiébaud E, Viard F (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the North coast of France. *Heredity* 94: 23-32.
- Jones R, Culver DC, Kane TC (1992) Are parallel morphologies of cave organisms the result of similar selection pressure? *Evolution* 46: 353-365.
- Kautenburger R (2006) Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA. *Pedobiologia* 50: 257-266.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions that compare studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 11-120.
- King RA, Tibble AL, Symondson WOC (2008) Opening a can of worms: unprecedented sympatric speciation within British lumbricid earthworms. *Molecular Ecology* 17: 4684-4698.
- Koene JM, Sundermann G, Michiels N (2002) On the function of body piercing during copulation in earthworms. *Invertebrate Reproduction and Development* 41 (1-3): 35-40.

- Koene JM, Pfoertner T, Michiels NK (2005) Piercing the partner's skin influences sperm uptake in the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 243-249.
- Kooch Y, Jalilvand H (2008) Earthworms as ecosystem engineers and the most important detritivores in forest soils. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (6): 819-825.
- Kreader CA (1996) Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 102-1106.
- Kreuzer K, Bonkowski M, Langel R, Scheu S (2004) Decomposer animals (Lumbricidae, Collembola) and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne* (Poaceae) and *Trifolium repens* (Fabaceae). *Soil Biology and Biochemistry* 36 (12): 2005-2011.
- Krijgsman W, Hilgen FJ, Raffi I, Sierro FJ, Wilson DS (1999) Chronology, causes and progression of the Messinian Salinity Crisis. *Nature* 400: 652-655.
- Latta RG, Mitton JB (1999) Historical separation and present gene flow through a zone of secondary contact in ponderosa pine. *Evolution* 53: 769-776.
- Lavelle P (1979) Relations entre types écologiques et profils démographiques chez les Vers de terre de la savane de Lamto (Côte-d'Ivoire). *Revue d'Écologie et Biologie du Sol* 16 (1): 85-101.
- Lavelle P (1981) Stratégies de reproduction chez les vers de terre. *Acta OEcologica/OEcologia Generalis* 2 (2): 117-133.
- Lavelle P (1983) The soil fauna of tropical savannas. I. The community structure. En: F. Bourlière (Ed.). *Tropical Savannas*. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, pp. 477-484.

- Lavelle P (1988) Earthworm activities and the soil system. *Biology and Fertility of Soils* 6: 237-251.
- Lavelle P, Spain AV (2001) Soil Ecology, Kluwer Academic Publishers, 654 pp.
- Lavelle P, Bignell D, Lepage M, Wolters V, Roger P, Ineson P, Heal OW, Dhillon S (1997) Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *European Journal of Soil Biology* 33: 159-193.
- Lee KE (1985) Earthworms: ecology and relationships with soils and land use. Academic Press, Sydney, 411 pp.
- Lee CE, Frost BW (2002) Morphological stasis in the *Eurytemora affinis* species complex (Copepoda: Temoridae). *Hydrobiologia* 480: 111-128.
- Lefébure T, Douady CJ, Gouy M, Trontelj P, Briolay J, Gibert J (2006) Phylogeography of a subterranean amphipod reveals cryptic diversity and dynamic evolution in extreme environments. *Molecular Ecology* 15: 1797-1806.
- Lentzsch P, Golldack J (2006) Genetic diversity of *Aporrectodea caliginosa* from agricultural sites in Northeast Brandenburg, Germany. *Pedobiologia* 50: 369-376.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Ligthart TN, Peek GJCW (1997) Evolution of earthworm burrow systems after inoculation of lumbricid earthworms in a pasture in the Netherlands. *Soil Biology and Biochemistry* 29: 453-462.

- Lunt DH (1996) The insect cytochrome oxidase I gene: Evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-165.
- Magri D, Fineschi S, Bellarosa R, Buonamici A, Sebastiani F, Schirone B, Simeone MC, Vendramin GG (2007) The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16: 5259-5266.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Mariño F, Trigo MD, Díaz Cosín DJ, Calvin EB (1985) Lombrices de tierra de Galicia. Relación con los factores del suelo. *Anales de Edafología y Agrobiología* 44: 1641-1649.
- Mariño MF, Velando A, Domínguez J (2006) Do earthworms trade sperm? The 8th International Symposium on Earthworm Ecology Krakow Poland, 4-9 Septiembre 2006. Sesión 5: *Behavioral and Evolutionary Biology*, p. 149 (Resumen).
- Mayr E (1948) The beating of the new systematics on genetical problems. The nature of species. *Advances in Genetics* 2: 205-237.
- Mayr E (1963) *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, 797 pp.
- McGuigan K, Sgrò CM (2009) Evolutionary consequences of cryptic genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 24 (6): 305-311.
- Medail F, Quezel P (1999) Biodiversity Hotspots in the Mediterranean Basin: Setting Global Conservation Priorities. *Conservation Biology* 13: 1510-1513.

- Meijer J (1972) An isolated earthworm population in the recently reclaimed Lauwerszeepolder. *Pedobiologia* 12: 409-411.
- Meyer WJ, Bowman H (1994) Mating period and cocoon production in *Eisenia fetida*. The 5<sup>th</sup> International Symposium on Earthworm Ecology, Columbus, Ohio, 5-9 Julio 1994, p. 128 (Resumen).
- Mezhzherin SV, Vlasenko RP, Garbar AV (2008) Genetic structure and peculiarities of earthworms *Aporrectodea* (superspecies) *caliginosa* (Oligochaeta: Lumbricidae) complex on the territory of Ukraine. *Tsitologiya i genetika* 42: 50-57.
- Michaelsen W (1899) Revision der Kinberg'schen Oligochaeten-Type, *Öfversigt Akademiens Förhandlingar, Stockholm* 56: 413-448.
- Michaelsen W (1900) Oligochaeta. Das Tierreich 10. P. Friedlander and Sohn, Berlin, 575 pp.
- Michaelsen W (1918) Die Lumbriciden, mit besonderer Berücksichtigung der bisher als Familie Glossoscolecidae zusammengefassten Unterfamilien. Zoologische Jahrbücher, Abteilung für Systematik, Jena, 398 pp.
- Michaelsen W (1925) Regenwürmer aus dem nördlichen und östlichen Spanien. *Senckenbergiana* 7: 186-195.
- Michiels NK (1998) Mating conflicts and sperm competition in simultaneous hermaphrodites. En: Birkhead R, Moller AP (Eds.) Sperm competition and sexual selection. Academic Press, London, pp. 219-254.
- Michiels NK, Hohner A, Vorndran IC (2001) Precopulatory mate assessment in relation to body size in the earthworm *Lumbricus terrestris*: avoidance of dangerous liaisons? *Behavioral Ecology* 12 (5): 612-618.
- Minamiya Y, Yokoyama J, Fukuda T (2009) A phylogeographic study of the Japanese earthworm, *Metaphire sieboldi* (Horst, 1883) (Oligochaeta: Megascolecidae):



- Inferences from mitochondrial DNA sequences. *European Journal of Soil Biology* 45: 423-430.
- Monroy F, Aira M, Velando A, Domínguez J (2003) Have spermatophores in *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) any reproductive role? *Pedobiologia* 47: 526-529.
- Monroy F, Aira M, Velando A (2005) Size-assortative mating in the earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). *Journal of Ethology* 23: 69-70.
- Moreno AG (1981) Estudio de algunas poblaciones de lombrices de tierra (Annelida: Oligochaeta: Lumbricidae, Megascolecidae y Glossoscolecidae) de los alrededores de Madrid. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 294 pp.
- Müller J (2000) Mitochondrial DNA variation and the evolutionary history of cryptic *Gammarus fossarum* types. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 260-268.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CC, da Fonseca GA, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 1510-1513.
- Nagy ZT (2010). A hands-on overview of tissue preservation methods for molecular genetic analyses. *Organisms diversity and Evolution* 10: 91-105.
- Nei M, Kumar S (2000) Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, UK, 333 pp.
- Nixon KC (2002) Winclada, version 1.00.08. Disponible en: <http://www.cladistics.com>
- Novo M, Velavan TP, Almodóvar A, Schulenburg H, Díaz Cosín DJ, Michiels NK (2008) Microsatellite markers for the drought-resistant earthworm *Hormogaster elisae*. *Molecular Ecology Resources* 8: 901-903.

- Novo M, Almodóvar A, Díaz-Cosín DJ (2009) High genetic divergence of hormogastrid earthworms (Annelida, Oligochaeta) in the central Iberian Peninsula: evolutionary and demographic implications. *Zoologica Scripta* 38 (5): 537-552.
- Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2010) Cryptic speciation of hormogastrid earthworms revealed by mitochondrial and nuclear data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 507-512.
- Novo M, Almodóvar A, Fernández R, Gutiérrez M, Díaz Cosín DJ. (en prensa) Mate choice of an endogeic earthworm revealed by microsatellite markers. Aceptado en *Pedobiologia*.
- Nuutinen V, Butt KR (1997) The mating behaviour of the earthworm *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae). *Journal of Zoology, London* 242: 783-798.
- Nygren A, Sundberg P (2003) Phylogeny and evolution of reproductive modes in Autolytinae (Syllidae, Annelida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 235-49.
- Oceguera-Figueroa A, León-Regagnon V, Siddall ME (2005) Phylogeny and revision of *Erpobdelliformes* (Annelida, Arhynchobdellida) from Mexico based on nuclear and mitochondrial gene sequences *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76 (2): 191-198.
- Olive PJW, Clark RB (1978) Physiology of reproduction. En: Mill PJ (Ed.) *Physiology of annelids*. Academic Press, London, pp. 271-368.
- Oliveira EJ, Padua JG, Zucchi MI, Vencovsky R, Vieira MLC (2006) Origin evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular biology* 29 (2): 294-307.
- Omodeo P (1956) Sistematica e distribuzione geografica degli Hormogastrinae (Oligocheti). *Archivio botanico e biogeografico italiano* 32: 159-177.

- Omodeo P (1998) History of Clitellata. *Italian Journal of Zoology* 65: 51-73.
- Omodeo P (2000) Evolution and biogeography of megadriles (Annelida, Clitellata). *Italian Journal of Zoology* 67: 179-201.
- Omodeo P, Rota E (2008) Earthworm diversity and land evolution in three mediterranean districts. *Proceedings of the California Academy of Sciences, Fourth Series* 59 (I, N. 5): 65-83.
- Ortiz-Ceballos A, Fragoso C (2006) Parental care of endogeic earthworm cocoons: is cleaning, construction, and cast surrounding of chambers related to hatching and survival of juvenile worms? The 8th International Symposium on Earthworm Ecology Krakow Poland, 4-9 Septiembre 2006. Sesión 5: *Behavioral and Evolutionary Biology*, p 150 (Resumen).
- Page AL, Miller RH, Keeney DR (1982) Methods in Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties. Agronomy 9, ASA-SSSA, Madison. Wisconsin. USA, pp. 903-907
- Page RDM, Holmes EC (1998) Molecular Evolution. A Phylogenetic Approach. Blackwell Science, Malden, 346 pp.
- Park SDE (2001) Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection. Tesis Doctoral. University of Dublin, Dublin, Irlanda.
- Parker GA (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in insects. *Biological Reviews* 45: 525-567.
- Parmelee RW, Beare MH, Cheng W, Hendrix PF, Rider SJ, Crossley DA JR, Coleman DC (1990) Earthworms and enchytraeids in conventional and no-tillage agroecosystems: A biocide approach to asses their role in organic matter breakdown. *Biology and Fertility Soils* 10: 1-10.

- Peles JD, Towler WI, Guttman SI (2003) Population genetic structure of earthworms (*Lumbricus rubellus*) in soils contaminated by heavy metals. *Ecotoxicology* 12: 379-386.
- Pérez-Losada M, Eiroa J, Mato S, Domínguez J (2005) Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences *Pedobiologia* 49: 317-324.
- Pérez-Losada M, Ricoy M, Marshall JC, Domínguez J (2009) Phylogenetic assessment of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* species complex (Oligochaeta: Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 293-302.
- Pfenninger M, Staubach S, Albrecht C, Schwenk K (2003) Ecological and morphological differentiation among cryptic evolutionary lineages in freshwater limpets of the nominal form-group *Ancylus fluviatilis* (O.F. Müller, 1774). *Molecular Ecology* 12: 2731-2745.
- Pearce TG, Oates K, Carruthers WJ (1990) A fossil earthworm embryo (Oligochaeta) from beneath a Late Bronze Age midden at Potterne, Wiltshire, UK. *Journal of Zoology* 220: 537-542.
- Pineau P, Henry M, Suspène R, Marchio A, Dettai A, Debruyne R, Petit T, Lécu A, Moisson P, Dejean A, Wain-Hobson S, Vartanian JP (2005) A Universal Primer Set for PCR amplification of Nuclear Histone H4 Genes from all Animal Species. *Molecular Biology and Evolution* 22: 582-588.
- Pleguezuelos JM (1997) Distribución y biogeografía de los anfibios y reptiles en España y Portugal. Universidad de Granada, Granada, 542 pp.
- Pogson GH, Taggart CT, Mesa KA, Boutilier RG (2001) Isolation by distance in the atlantic cod, *Gadus morhua*, at large and small geographic scales. *Evolution* 55: 131-146.

- Pop AA, Wink M, Pop VV (2003) Use of 18S, 16S rDNA and cytochrome c oxidase sequences in earthworm taxonomy (Oligochaeta, Lumbricidae). *Pedobiologia* 47: 428-433.
- Pop AA, Cech G, Csuzdi C, Wink M, Pop VV (2005) An attempt to reconstruct the molecular phylogeny of the genus *Allolobophora* Eisen, 1874 (*sensu lato*, Pop, 1941) using 16S rDNA and COI sequences (Oligochaeta, Lumbricidae). En: Pop VV, Pop AA (Eds.) *Advances in Earthworm Taxonomy II*. Cluj University Press, Cluj-Napoca, pp. 155-165.
- Pop AA, Cech G, Wink M, Csuzdi C, Pop VV (2007) Application of 16S, 18S rDNA and COI sequences in the molecular systematics of the earthworm family Lumbricidae (Annelida, Oligochaeta). *European Journal of Soil Biology* 43: 43-52.
- Pop AA, Csuzdi C, Wink M, Pop VV (2008a) Molecular taxonomy and phylogeny of the genera *Octolasion* Örley, 1885, *Octodrilus* Omodeo, 1856 and *Octodriloides* Zicsi, 1986 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on nucleotide sequences of mitochondrial 16S rDNA and COI genes. En: Pavlıcek T, Cardet P (Eds.) *Advances in Earthworm Taxonomy III*. Environment Service of the Ministry of Agriculture. Natural Resources and Environment of the Republic of Cyprus, Nicosia, pp. 109-125.
- Pop AA, Wink M, Csuzdi C (2008b) Progress in systematic of terrestrial Oligochaeta by using molecular methods. En: Pavlıcek T, Cardet P (Eds.) *Advances in Earthworm Taxonomy III*. Environment Service of the Ministry of Agriculture. Natural Resources and Environment of the Republic of Cyprus, Nicosia, pp. 203-224.
- Porto PG, Velando A, Domínguez J (2008) Effects of mating frequency on sex allocation in the simultaneously hermaphroditic redworm (*Eisenia andrei*). The 15<sup>th</sup> International Colloquium on Soil Zoology Curitiba Brazil, 25-29 Agosto 2008. Sesión 1: *Soil Animal Biodiversity: the final frontier*, SIT1P14.(Resumen).

- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1253-1256.
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14 (9): 817-818.
- Posada D, Crandall KA (2001) Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16 (1): 37-45.
- Poyton RO, Trueblood CE, Wright RM, Farrell LE (1988) Expression and function of cytochrome c oxidase subunit isologues. Modulators of cellular energy production Cytochrome oxidase: structure, function and physiology. *Annals of the New York Academy of Science* 550: 289-307.
- Proudlove G, Wood PJ (2003) The blind leading the blind: cryptic subterranean species and DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 272-273.
- Purcell S, Cherny SS, Sham PC (2003) Genetic Power Calculator: design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19 (1): 149-150.
- Qiu JP, Bouché MB (1998) Contribution to the taxonomy of Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of new species from Spain. *Documents Pedozoologiques et Integrologiques* 4 (15): 164-177.
- Ramajo M (2010) Relaciones interespecíficas de lombrices de tierra en una parcela de El Molar (Madrid). Tesis doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 301 pp.
- Ramos-Onsis SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution* 19: 2092-2100.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP 3.4, Population genetics software for exact tests and ecomenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

- Richards KS, Fleming TP (1982) Spermatozoal phagocytosis by the spermathecae of *Dendrobaena subrubicunda* and other lumbricids (Oligochaeta, Annelida). *International Journal of Invertebrate Reproduction* 5: 233-241.
- Rogers AR (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49: 608-615.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Romanowski G, Lorenz MG, Wackernagel W (1993) Use of polymerase chain reaction and electroporation of *Escherichia coli* to monitor the persistence of extracellular plasmid DNA introduced into natural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 3438-3446.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosa D (1887) *Hormogaster redii* n. g., n. sp. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia comparata della Università di Torino* 32 (II).
- Rosa D (1888) Sulla struttura dell'*Hormogaster redii* mihi. *Bollettino dei Musei di Zoologia ed Anatomia comparata della Università di Torino* 35 (III).
- Rosenbaum G, Lister GS, Duboz C (2002) Reconstruction of the tectonic evolution of the western Mediterranean since the Oligocene. En: Rosenbaum G, Lister GS (Eds.) Reconstruction of the evolution of the Alpine-Himalayan Orogen. *Journal of the Virtual Explorer* 8: 107-130.
- Rota E (1993) Contribution to the taxonomy of the Hormogastridae (Annelida: Oligochaeta) with description of two new species from southern France. *Journal of Natural History* 28: 27-36.

- Rota E, Omodeo P (1992) Phylogeny of Lumbricina: re-examination by an authoritative process. *Soil Biology and Biochemistry* 24: 1263-1277.
- Rousset F (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from *F*-statistics under isolation by distance. *Genetics* 145: 1219-1228.
- Rousset V, Rouse G, Siddall ME, Tillier A, Pleijel F (2004) The phylogenetic position of Sibolginidae (Annelida) inferred from 18S rRNA, 28S rRNA and morphological data. *Cladistics* 20: 518-33.
- Rozas J, Sánchez del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruiz MP (2003) Biología de *Hormogaster elisae* Álvarez, 1977 (procesos de alimentación y estivación). Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España, 145 pp.
- Ruiz MP, Ramajo M, Jesús JB, Trigo D, Díaz Cosín DJ (2006) Selective feeding of the earthworm *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in laboratory culture. *European Journal of Soil Biology* 42: S289-S295.
- Saccone C, de Giorgi C, Gissi C, Pesole G, Reyes A (1999) Evolutionary genomics in *Metazoa*: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195-209.
- Sahm S, Velavan TP, Schulenburg H, Michiels NK (2009) Reconstruction of mating history - a retrospective analysis of *Lumbricus terrestris* mate choice criteria in natural populations. En: Velavan TP 2009. Population genetics of Host - Parasite interactions in *Lumbricus terrestris* and *Monocystis* sp. (Apicomplexa: Gregarinae). Tesis Doctoral, Tübingen University, Tübingen, Alemania, pp. 43-57.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.



- Sanderson MJ (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1218-1231.
- Sanderson M (2006) r8s version 1.71. Disponible en: <http://loco.biosci.arizona.edu/r8s/>.
- Satchell, J.E. 1983. Earthworm Ecology: from Darwin to vermiculture. Chapman and Hall. Londres, 495 pp.
- Schander C, Halanych KM (2003) DNA, PCR and formalinized animal tissue- a short review and protocols. *Organisms Diversity and Evolution* 3: 195-205.
- Schettino A, Turco E (2006) Plate kinematics of the Western Mediterranean region during the Oligocene and Early Miocene. *Geophysical Journal International* 166 (3): 1398-1423.
- Scheu S (2003) Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47: 846-856.
- Schmidt TR, Jaradat SA, Goodman M, Lomax MI, Grossman LI (1997) Molecular Evolution of Cytochrome c Oxidase: Rate Variation Among Subunits Via Isoforms. *Molecular Biology and Evolution* 14: 595-601.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva. Switzerland.
- Schulenburg JH, Hancock JM, Pagnamenta A, Sloggett JJ, Majerus ME, Hurst GD (2001). Extreme length and length variation in the first ribosomal internal transcribed spacer of ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae). *Molecular Biology and Evolution* 18: 648-660.

- Schwert DP, Dance KW (1979) Earthworm cocoons as a drift component in a southern Ontario stream. *Canadian Field-Naturalist* 93: 180-183.
- Selkoe KA, Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.
- Shepeleva OA, Kodolova OP, Zhukovskaya EA, Striganova BR (2008) Genetic diversity of populations of the earthworm *Lumbricus rubellus* (Hoffm.) (Oligochaeta, Lumbricidae). *Biology Bulletin* 35: 170-177.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994) Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-70.
- Simonsen V, Scott-Fordsmand JJ (2004) Genetic variation in the enzyme esterase, bioaccumulation and life history traits in the earthworm *Lumbricus rubellus* from a metal contaminated area, Avonmouth, England. *Ecotoxicology* 13: 773-786.
- Simonsen V, Laskowski R, Bayley M, Holmstrup M (2008) Low impact of metal pollution on genetic variation in the earthworm *Dendrobaena octaedra* measured by allozymes. *Pedobiologia* 52: 51-60.
- Sims RW, Gerard BM (1999) Earthworms, notes for the identification of British species. En: Barnes RSK, Crothers JH (Eds.) Synopses of the British fauna (new series), no. 31 revised. Field Studies Council, Shrewsbury.
- Slatkin M (1993) Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.
- Slatkin M (1994) Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics* 137: 331-336.

- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Smith SA, Dunn CW (2008) Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments, and molecular data. *Bioinformatics* 24: 715-716.
- Stephenson J (1930) The Oligochaeta. Clarendon Press, Oxford, 978 pp.
- Stille B, Ochman H, Selander RK (1980) Genetic structure of populations of the earthworm *Aporrectodea tuberculata*. *Oikos* 34: 195-201.
- Stoks R, Nystrom JL, May ML, McPeck MA (2005) Parallel evolution in ecological and reproductive traits to produce cryptic damselfly species across the Holarctic. *Evolution* 59: 1976-1988.
- Strassmann JE, Barefield K, Solís CR, Hughes CR, Queller DC (1997) Trinucleotide microsatellite loci for a social wasp, *Polistes*. *Molecular Ecology* 6: 97-100.
- Stürzenbaum SR, Andre J, Kille P, Morgan AJ (2009) Earthworm genomes, genes and proteins: the (re) discovery of Darwin's worms. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 276: 789-797.
- Swofford, D.L. (2002). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taanman JW (1997) Human Cytochrome *c* Oxidase: Structure, Function, and Deficiency. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29 (2): 151-163.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

- Talavera G, Castresana J (2007) Improvement of Phylogenies after Removing Divergent and Ambiguously Aligned Blocks from Protein Sequence Alignments. *Systematic Biology* 56: 564-577.
- Tato A, Velando A, Domínguez J (2006) Influence of size and partner preference on the female function of the earthworm *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae). *European Journal of Soil Biology* 42: S331-S333.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619-633.
- Terhivuo J (1988) The Finnish Lumbricidae (Oligochaeta) fauna and its formation. *Annales Zoologici Fennici* 25: 229-247.
- Terhivuo J, Saura A (1990) Allozyme variation in parthenogenetic *Dendrobaena octaedra* (Oligochaeta: Lumbricidae) populations of eastern Fennoscandia. *Pedobiologia* 34: 113-139.
- Terhivuo J, Saura A (1993a) Clonal and morphological variation in marginal populations of parthenogenetic earthworms *Octolasion tyrtaeum* and *O. cyaneum* (Oligochaeta, Lumbricidae) from Eastern Fennoscandia. *Bolletino di Zoologia* 60: 87-96.
- Terhivuo J, Saura A (1993b) Genic and morphological variation of the parthenogenetic earthworm *Aporrectodea rosea* in Southern Finland (Oligochaeta, Lumbricidae). *Annales Zoologici Fennici* 30: 215-224.
- Terhivuo J, Saura A (1996) Clone pool structure and morphometric variation in endogeic and epigeic North European parthenogenetic earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae). *Pedobiologia* 40: 226-239.

- Terhivuo J, Saura A (1997) Island biogeography of North European parthenogenetic Lumbricidae. 1. Clone pool affinities and morphometric differentiation of Åland populations. *Ecography* 20: 185-196.
- Terhivuo J, Saura A (2003) Low clonal diversity and morphometrics in the parthenogenetic earthworm *Octolasion cyaneum* (Sav.). *Pedobiologia* 47: 434-439.
- Terhivuo J, Saura A (2008) Clone distribution of the earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta: Lumbricidae) across an altitudinal gradient on subarctic mountains of NW Europe. *Pedobiologia* 51: 375-384.
- Terhivuo J, Saura A, Hongell K, Lokki J (1987) Enzymatic and morphometric variation of *Dendrobaena octaedra* Sav. Oligochaeta: Lumbricidae in eastern Fennoscandia - a preliminary report. En: Bonvicini AM, Omodeo P (Eds.). On Earthworms. Mucchi, Modena, pp. 89-102.
- Terhivuo J, Saura A, Hongell K (1994) Genetic and morphological variation in the parthenogenetic earthworm *Eiseniella tetraedra* (Sav.) (Oligochaeta, Lumbricidae) from South Finland and North Norway. *Pedobiologia* 38: 81-96.
- Terhivuo J, Lundqvist E, Saura A (2002) Clone diversity of *Eiseniella tetraedra* (Oligochaeta: Lumbricidae) along regulated and free-flowing boreal rivers. *Ecography* 25: 714-720.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Thornhill R (1983) Cryptic female choice and its implications in the scorpionfly *Harpobittacus nigriceps*. *American Naturalist* 122 (6): 765-788.
- Tóth G, Gáspári Z, Jurka J (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

- Trontelj P, Utevsky SY (2005) Celebrity with a neglected taxonomy: molecular systematics of the medicinal leech (genus *Hirudo*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 616-624.
- Tsai YL, Olson BH (1992) Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 2292-2299.
- Tully T, D'Haese CA, Richard M, Ferriere R (2006) Two major evolutionary lineages revealed by molecular phylogeny in the parthenogenetic collembola species *Folsomia candida*. *Pedobiologia* 50: 95-104.
- Turgeon J, Bernatchez L (2001) Clinal variation at microsatellite loci reveals historical secondary intergradation between glacial races of *Coregonus artedii* (Teleostei: Coregoninae). *Evolution* 55: 2274-2286.
- Uvarov AV (2009) Inter-and intraspecific interactions in lumbricid earthworms: Their role for earthworm performance and ecosystem. *Pedobiologia* 53 (1): 1-27.
- Valle JV, Moro RP, Garvín MH, Trigo D, Díaz Cosín DJ (1997) Annual dynamics of the earthworm *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in Central Spain. *Soil Biology and Biochemistry* 29 (3-4): 309-312.
- Valle JV, Moro RP, Garvín MH, Trigo D, Díaz Cosín DJ (1998) Growth in the laboratory of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae). *Applied Soil Ecology* 9: 111-114.
- Valle JV, Garvín MH, Trigo D, Martínez F, Belinchón C, Díaz Cosín DJ (1999) Vertical distribution of *Hormogaster elisae* (Oligochaeta, Hormogastridae) in soil at El Molar (Central Spain). *Pedobiologia* 43: 859-865.
- Van Praagh BD (1995) Reproductive biology of *Megascolides australis* McCoy (Oligochaeta: Megascolecidae). *Australian Journal of Zoology* 43 (5): 489-507.

- Varón A, Vinh LS, Wheeler WC (2009) POY version 4: phylogenetic analysis using dynamic homologies. *Cladistics* 25: 1-14.
- Varuta AT, More NK (1972) Cytochemical study of mucus and mucus secreting cells in spermathecae of the earthworms, *Pheretima elongata* (Perrier) and *Hoplochaetella powelli* (Michaelsen). *Indian Journal of Experimental Biology* 10: 239-241
- Velando A, Domínguez J, Ferreiro A (2006) Inbreeding and outbreeding reduces cocoon production in the earthworm *Eisenia andrei*. *European Journal of Soil Biology* 42: S354-S357.
- Velando A, Eiroa J, Dominguez J (2008) Brainless but not clueless: earthworms boost their ejaculates when they detect fecund non-virgin partners. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 275 (1638): 1067-1072.
- Velavan TP (2009) Population genetics of Host-Parasite interactions in *Lumbricus terrestris* and *Monocystis* sp. (Apicomplexa: Gregarineae). Tesis Doctoral. Universidad de Tübingen, Tübingen, Alemania, 104 pp.
- Velavan TP, Schulenburg H, Michiels N (2007) Development and characterization of novel microsatellite markers for the common earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). *Molecular Ecology Notes* 7: 1060-1062.
- Velavan TP, Sahm S, Schulenburg H, Michiels NK (2009) High genetic diversity and heterogeneous parasite load in the earthworm *Lumbricus terrestris* on a German meadow. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (8): 1591-1595.
- Vyas I, Dev B (1972) Histochemical localization of alkaline phosphatase in the spermathecae of the earthworm, *Barogaster annandalei* (Stephenson). *Acta Histochemica* 42: 344-350.
- Wallwork JA (1983) Earthworm biology. Camelot Press, Southhamton, UK, 58 pp.

- Watterson GA (1984) Allele frequencies after a bottleneck. *Theoretical Population Biology* 26: 387-407.
- Watterson GA, Guess HA (1977) Is the most frequent allele the oldest? *Theoretical Population Biology* 11: 141-160.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wheeler WC (1995) Sequence alignment, parameter sensitivity, and the phylogenetic analysis of molecular data. *Systematic Biology* 44: 321-331.
- Wheeler WC (1996) Optimization alignment: the end of multiple sequence alignment in phylogenetics? *Cladistics* 12: 1-9.
- Wheeler WC (2003) Implied alignment: a synapomorphy based multiple-sequence alignment method and its use in cladogram search. *Cladistics* 19: 261-268.
- Whiting MF, Carpenter JM, Wheeler QD, Wheeler WC (1997) The Strepsiptera problem: phylogeny of the holometabolous insect orders inferred from 18S and 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Systematic Biology* 46: 1-68.
- Wiens J (1998) Combining data sets with different phylogenetic histories. *Systematic Biology* 556 (47): 568-581.
- Wiens JJ, Penkrot TA (2002) Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (*Sceloporus*). *Systematic Biology* 51 (1): 69-91.
- Wiens JJ, Chippindale PT, Hillis DM (2003) When are phylogenetic analyses misled by convergence? A case study in Texas cave salamanders. *Systematic Biology* 52: 501-514.



- Wilke T, Pfenninger M (2002) Separating historic events from recurrent processes in cryptic species: phylogeography of mud snails (*Hydrobia* spp.). *Molecular Ecology* 11: 1439-1451.
- Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *International Review of Cytology* 141: 173-216.
- Wright S (1943) Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-113.
- Xia X, Xie Z (2001) DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhang QL, Hendrix PF (1995) Earthworm (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*) Effects on Carbon Flux in Soil. *Soil Science Society of America Journal* 59 (3): 816-823.
- Zhukovskaya EA, Kodolova OP, Pravdukhina OY, Barne AZ, Bolotetskii NM (2005) Study of genetic diversity of earthworm *Lumbricus rubellus* Hoff. (Oligochaeta, Lumbricidae). *Biology Bulletin* 32: 518-520.
- Zicsi, A. Neue (1970) Neue Regenwürmer (Oligochaeta: Hormogastridae, Lumbricidae) aus Spanien. *Opuscula Zoologica (Budapest)* X (2): 371-373.

## **XI. Anexos**

## ANEXO I

[illegible]

Posiciones variables en el fragmento secuenciado del gen COI. Los haplotipos se representan con la abreviatura de la localidad de la que proceden (véase Tabla IV.1).

Se toma como referencia SIG3 por ser el haplotipo más frecuente de la localidad de Siguero, lugar donde se describió la especie.

## ANEXO I

[illegible]

## ANEXO I

[illegible]

**ANEXO II.** (Página siguiente) Frecuencias de haplotipos del gen COI en los individuos de *H. elisae* estudiados y números de acceso para las secuencias en la base de datos GenBank. Debajo del nombre de cada localidad se indica el número de individuos (N) incluidos en el análisis. Tras el valor relativo de la frecuencia, se indica entre paréntesis el número de individuos que presentan ese haplotipo.

Haplotipo	Número de acceso	Anchuelo N9	Lozoyuela N12	Molar N12	Redueña N14	Pardo N12	Sevilla N12	Siguero N11
ANC1	EF653870	0,222 (2)						
ANC2	EF653871	0,111 (1)						
ANC3	EF653868	0,111 (1)						
ANC4	EF653869	0,222 (2)						
ANC5	EF653872	0,222 (2)						
ANC6	EF653873	0,111 (1)						
LOZ1	EF653888		0,0833 (1)					
LOZ2	EF653889		0,167 (2)					
LOZ3	EF653886		0,167 (2)					
LOZ4	EF653887		0,25 (3)					
LOZ5	EF653890		0,333 (4)					
MOL1	EF653874			0,167(2)				
MOL2	EF653875			0,167(2)				
MOL3	EF653876			0,0833(1)				
MOL4	EF653877			0,25(3)				
MOL5	EF653878			0,167(2)				
MOL6	EF653879			0,0833(1)				
MOL7	EF653880			0,0833(1)				
RED1	EF653883				0,286(4)			
RED2	EF653881				0,0714(1)			
RED3	EF653884				0,0714(1)			
RED4	EF653882				0,0714(1)			
RED5	EF653885				0,5(7)			
PAR1	EF653898					0,0833(1)		
PAR2	EF653900					0,0833(1)		
PAR3	EF653901					0,0833(1)		
PAR4	EF653899					0,417(5)		
PAR5	EF653902					0,333(4)		
SEV1	EF653905						0,167(2)	
SEV2	EF653903						0,333(4)	
SEV3	EF653904						0,5(6)	
SIG1	EF653893							0,0909(1)
SIG2	EF653891							0,0909(1)
SIG3	EF653892							0,455(5)
SIG4	EF653894							0,0909(1)
SIG5	EF653895							0,0909(1)
SIG6	EF653896							0,0909(1)
SIG7	EF653897							0,0909(1)

Localidad	NCOI	NHAP	<i>H</i>	$\pi$	<i>S</i>	Sust.	Ts	Tv	K2P
ALE	10	1	0	0	0	0	0	0	0
ALG	1	1	1	0	0	0	0	0	0
ANC	9	6	0,92 (0,07)	0,003 (0,002)	5	5	4	1	0,27
BSM	1	1	1	0	0	0	0	0	0
BIO	8	3	0,46 (0,20)	0,001 (0,001)	2	2	2	0	0,10
BOA	12	4	0,56 (0,15)	0,001 (0,001)	3	3	3	0	0,10
BRU	1	1	1	0	0	0	0	0	0
CAB	12	1	0	0	0	0	0	0	0
CER	8	7	0,96 (0,08)	0,011 (0,007)	26	26	25	1	1,14
TES	6	4	0,80 (0,17)	0,008 (0,005)	15	15	14	1	0,79
UCE	12	6	0,85 (0,07)	0,010 (0,006)	17	17	14	3	0,99
FRE	2	2	1,00 (0,50)	0,037 (0,037)	23	23	21	2	3,67
GHI	6	5	0,93 (0,12)	0,008 (0,005)	12	12	10	2	0,76
GRA	8	7	0,96 (0,08)	0,005 (0,003)	9	9	9	0	0,47
IGL	8	5	0,86 (0,11)	0,003 (0,002)	5	5	4	1	0,32
LAC	8	6	0,92 (0,08)	0,037 (0,021)	46	46	38	8	3,68
LOP	8	3	0,61 (0,16)	0,001 (0,001)	2	2	2	0	0,10
LOZ	22	7	0,79 (0,07)	0,016 (0,008)	24	24	20	4	1,60
MND	8	5	0,93 (0,08)	0,094 (0,052)	94	96	73	23	7,06
MOL	12	7	0,91 (0,06)	0,010 (0,006)	21	21	17	4	1,03
MON	8	4	0,75 (0,14)	0,005 (0,003)	9	9	8	1	0,47
MAJ	2	2	1,00 (0,50)	0,005 (0,005)	3	3	3	0	0,47
NAV	12	6	0,68 (0,15)	0,002 (0,002)	7	7	5	2	0,22
ORD	6	2	0,33 (0,22)	0,001 (0,001)	2	2	1	1	0,10
JAR	12	6	0,82 (0,08)	0,014 (0,008)	20	20	17	3	1,45
PAR	12	5	0,76 (0,09)	0,002 (0,002)	5	5	5	0	0,25
OEL	8	2	0,43 (0,17)	0,009 (0,005)	13	13	11	2	0,88
PRB	2	2	1,00 (0,50)	0,006 (0,007)	4	4	4	0	0,62
PIG	5	3	0,70 (0,22)	0,001 (0,001)	2	2	2	0	0,12
QUE	8	2	0,54 (0,12)	0,012 (0,007)	14	14	11	3	1,18
QLL	1	1	1	0	0	0	0	0	0
RED	26	9	0,80 (0,06)	0,039 (0,020)	58	59	52	7	3,90
SGF	6	3	0,73 (0,16)	0,001 (0,001)	2	2	1	1	0,14
XAN	8	3	0,68 (0,12)	0,004 (0,003)	5	5	5	0	0,37
SAN	8	3	0,61 (0,16)	0,001 (0,001)	2	2	2	0	0,10
SEV	12	3	0,67 (0,09)	0,002 (0,001)	3	3	2	1	0,17
SIG	11	7	0,82 (0,12)	0,009 (0,005)	15	15	15	0	0,92
SOT	12	3	0,68 (0,09)	0,003 (0,002)	4	4	4	0	0,32
TAL	3	1	0	0	0	0	0	0	0
TOR	8	2	0,54 (0,12)	0,003 (0,002)	4	4	4	0	0,33
TRE	12	5	0,83 (0,07)	0,048 (0,025)	63	64	51	13	4,77
UIX	8	5	0,89 (0,09)	0,009 (0,005)	17	17	14	3	0,86
VEN	12	3	0,67 (0,09)	0,021 (0,011)	24	24	20	4	2,08
VIL	4	1	0	0	0	0	0	0	0
VPJ	7	5	0,90 (0,10)	0,007 (0,004)	9	9	3	6	0,67

**ANEXO III.** Medidas de variabilidad intrapoblacional para Hormogastridae en las distintas localidades basada en el fragmento mitocondrial COI. Los valores entre paréntesis indican la varianza. N, número de individuos recogidos en cada población; NHAP, número de haplotipos diferentes encontrados en una localidad; *H*, diversidad haplotípica;  $\pi$ , diversidad nucleotídica; *S*, número de posiciones polimórficas; Sust, sustituciones; Ts, número de transiciones; Tv, número de transversiones; K2P, valores de divergencia genética intrapoblacional calculada mediante el modelo de Kimura 2-parámetros y expresada como porcentaje de cambios. Véase el nombre de la localidad completo en la Tabla VI.1.



Localidad	N16S	NHAP	<i>H</i>	$\pi$	<i>S</i>	Sust.	Gaps	Ts	Tv	K2P
ALE	10	3	0,64 (0,10)	0,0003 (0,0004)	2	1	1	1	0	0,03
ALG	1	1	1,00 (0,00)	0	0	0	0	0	0	0,00
ANC	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0
BSM	1	1	1,00 (0,00)	0	0	0	0	0	0	0,00
BIO	8	3	0,71 (0,12)	0,001 (0,001)	2	2	0	2	0	0,11
BOA	12	4	0,68 (0,10)	0,001 (0,001)	4	4	0	3	1	0,12
BRU	1	1	1,00 (0,00)	0	0	0	0	0	0	0,00
CAB	12	3	0,32 (0,16)	0,0006 (0,0007)	3	3	0	0	3	0,06
CER	8	4	0,82 (0,10)	0,003 (0,002)	7	7	0	6	1	0,28
TES	6	4	0,80 (0,17)	0,002 (0,002)	5	5	0	4	1	0,21
UCE	12	7	0,88 (0,08)	0,004 (0,003)	11	11	0	10	1	0,44
FRE	2	2	1,00 (0,50)	0,010 (0,011)	8	8	0	7	1	1,03
GHI	5	4	0,90 (0,16)	0,002 (0,001)	3	3	0	3	0	0,18
GRA	8	7	0,97 (0,08)	0,002 (0,002)	6	6	0	4	2	0,21
IGL	8	4	0,75 (0,14)	0,003 (0,002)	9	9	0	8	1	0,31
LAC	8	5	0,92 (0,08)	0,019 (0,011)	32	30	2	23	7	1,92
LOP	8	2	0,25 (0,18)	0,006 (0,004)	21	19	2	12	7	0,61
LOZ	22	6	0,78 (0,06)	0,006 (0,003)	11	11	0	7	4	0,60
MND	8	4	0,82 (0,10)	0,021 (0,012)	40	39	1	27	12	2,14
MOL	12	5	0,67 (0,14)	0,002 (0,002)	7	6	1	4	2	0,24
MON	8	5	0,86 (0,11)	0,008 (0,005)	25	24	2	16	8	0,83
MAJ	2	2	1,00 (0,50)	0,003 (0,003)	2	2	0	1	1	0,25
NAV	12	5	0,79 (0,09)	0,0004 (0,0005)	6	2	4	2	0	0,04
ORD	7	5	0,90 (0,10)	0,002 (0,001)	4	4	0	4	0	0,18
JAR	11	7	0,87 (0,09)	0,009 (0,006)	17	17	0	17	0	0,99
PAR	7	2	0,48 (0,17)	0,060 (0,034)	125	92	33	43	49	6,03
OEL	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0,00
PRB	2	2	1,00 (0,50)	0,001 (0,002)	1	1	0	0	1	0,13
PIG	5	3	0,70 (0,22)	0,001 (0,001)	2	2	0	1	1	0,10
QUE	8	2	0,53 (0,12)	0,004 (0,003)	6	6	0	6	0	0,41
QLL	1	1	1,00 (0,00)	0	0	0	0	0	0	0,00
RED	26	6	0,71 (0,06)	0,011 (0,006)	24	23	1	16	7	1,14
SGF	6	2	0,33 (0,21)	0	1	0	1	0	0	0,00
XAN	8	3	0,68 (0,12)	0,002 (0,001)	4	3	1	1	2	0,17
SAN	8	2	0,43 (0,17)	0,0005 (0,0006)	1	1	0	1	0	0,05
SEV	12	2	0,41 (0,13)	0,0005 (0,0006)	1	1	0	0	1	0,05
SIG	11	9	0,95 (0,07)	0,003 (0,002)	7	7	0	6	1	0,30
SOT	12	7	0,91 (0,06)	0,005 (0,003)	11	10	1	7	3	0,53
TAL	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0,00
TOR	8	2	0,25 (0,18)	0	1	0	1	0	0	0,00
TRE	12	5	0,82 (0,07)	0,012 (0,007)	21	23	0	15	8	1,17
UIX	8	3	0,61 (0,16)	0,003 (0,002)	9	8	1	7	1	0,28
VEN	12	4	0,68 (0,10)	0,006 (0,004)	11	10	1	8	2	0,64
VIL	8	6	0,89 (0,11)	0,003 (0,002)	6	6	0	6	0	0,29
VPJ	7	4	0,71 (0,18)	0,003 (0,002)	5	5	0	4	1	0,28

**ANEXO IV.** Medidas de variabilidad intrapoblacional para Hormogastridae en las distintas localidades basada en el fragmento mitocondrial 16S-tRNA. Los valores entre paréntesis indican la varianza. N, número de individuos recogidos en cada población; NHAP, número de haplotipos diferentes encontrados en una localidad; *H*, diversidad haplotípica;  $\pi$ , diversidad nucleotídica; *S*, número de posiciones polimórficas; Sust, sustituciones; Ts, número de transiciones; Tv, número de transversiones; K2P, valores de divergencia genética intrapoblacional calculada mediante el modelo de Kimura 2-parámetros y expresada como porcentaje de cambios. Véase el nombre de la localidad completo en la Tabla VI.1.

Localidad	NH3	NHAP	<i>H</i>	$\pi$	<i>S</i>	Sust.	Ts	Tv	K2P
ALE	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
ALG	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
ANC	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,002 (0,002)	1	1	0	1	0,16
BSM	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
BIO	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,002 (0,002)	1	1	0	1	0,16
BOA	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
BRU	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
CAB	4 /8	3	0,68 (0,12)	0,003 (0,002)	2	2	0	2	0,25
CER	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
TES	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
UCE	4 /8	2	0,43 (0,17)	0,003 (0,002)	2	2	1	1	0,26
FRE	2 /4	2	0,67 (0,20)	0,002 (0,002)	1	1	0	1	0,20
GHI	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
GRA	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
IGL	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,002 (0,002)	1	1	0	1	0,16
LAC	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
LOP	3 /6	2	0,53 (0,17)	0,003 (0,003)	2	2	2	0	0,33
LOZ	7 /14	3	0,54 (0,11)	0,004 (0,003)	3	3	2	1	0,42
MND	4 /8	3	0,71 (0,12)	0,005 (0,004)	4	4	4	0	0,53
MOL	9 /18	6	0,69 (0,11)	0,003 (0,003)	4	5	3	2	0,35
MON	4 /8	2	0,25 (0,18)	0,001 (0,001)	1	1	1	0	0,08
MAJ	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
NAV	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
ORD	4 /8	2	0,43 (0,17)	0,001 (0,001)	1	1	1	0	0,13
JAR	4 /8	7	0,96 (0,08)	0,006 (0,004)	4	4	4	0	0,60
PAR	3 /6	4	0,87 (0,13)	0,004 (0,003)	3	3	2	1	0,43
OEL	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
PRB	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
PIG	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
QUE	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
QLL	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
RED	3 /6	3	0,73 (0,16)	0,005 (0,004)	3	3	2	1	0,51
SGF	3 /6	1	0	0	0	0	0	0	0
XAN	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
SAN	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
SEV	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
SIG	4 /8	3	0,61 (0,16)	0,005 (0,004)	4	4	4	0	0,47
SOT	4 /8	3	0,75 (0,10)	0,003 (0,003)	2	2	1	1	0,29
TAL	3 /6	1	0	0	0	0	0	0	0
TOR	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
TRE	4 /8	3	0,71 (0,12)	0,003 (0,003)	2	2	2	0	0,31
UIX	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
VEN	4 /8	4	0,82 (0,10)	0,005 (0,004)	3	4	2	2	0,51
VIL	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
VPJ	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0

**ANEXO V.** Medidas de variabilidad intrapoblacional para Hormogastridae en las distintas localidades basada en el fragmento nuclear H3. Los valores entre paréntesis indican la varianza. N, número de individuos recogidos en cada población / número de alelos; NHAP, número de haplotipos diferentes encontrados en una localidad; *H*, diversidad haplotípica;  $\pi$ , diversidad nucleotídica; *S*, número de posiciones polimórficas; Sust, sustituciones; Ts, número de transiciones; Tv, número de transversiones; K2P, valores de divergencia genética intrapoblacional calculada mediante el modelo de Kimura 2-parámetros y expresada como porcentaje de cambios. Véase el nombre de la localidad completo en la Tabla VI.1.

Localidad	NH4	NHAP	<i>H</i>	$\pi$	<i>S</i>	Sust.	Ts	Tv	K2P
ALE	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
ALG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ANC	4 /8	2	0,25 (0,18)	0,001 (0,002)	1	1	1	0	0,14
BSM	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
BIO	4 /8	3	0,68 (0,12)	0,006 (0,005)	2	2	1	1	0,61
BOA	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
BRU	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
CAB	3 /6	3	0,60 (0,22)	0,008 (0,007)	2	2	2	0	0,85
CER	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
TES	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
UCE	3 /6	1	0	0	0	0	0	0	0
FRE	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
GHI	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
GRA	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
IGL	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
LAC	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
LOP	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
LOZ	6 /12	2	0,17 (0,13)	0,001 (0,001)	1	1	0	1	0,09
MND	3 /6	2	0,53 (0,17)	0,012 (0,009)	4	4	2	2	1,18
MOL	8 /16	3	0,58 (0,08)	0,003 (0,003)	2	2	2	0	0,36
MON	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,003 (0,003)	1	1	0	1	0,29
MAJ	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
NAV	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
ORD	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
JAR	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
PAR	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
OEL	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
PRB	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
PIG	4 /8	2	0,25 (0,18)	0,0014 (0,002)	1	1	1	0	0,14
QUE	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,003 (0,003)	1	1	1	0	0,29
QLL	1 /2	1	0	0	0	0	0	0	0
RED	2 /4	1	0	0	0	0	0	0	0
SGF	3 /6	1	0	0	0	0	0	0	0
XAN	3 /6	1	0	0	0	0	0	0	0
SAN	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
SEV	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
SIG	5 /10	2	0,20 (0,15)	0,001 (0,002)	1	1	1	0	0,11
SOT	4 /8	2	0,57 (0,09)	0,003 (0,003)	1	1	1	0	0,31
TAL	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
TOR	4 /8	1	0	0	0	0	0	0	0
TRE	4 /8	3	0,71 (0,12)	0,006 (0,005)	2	2	2	0	0,55
UIX	4 /8	3	0,46 (0,20)	0,003 (0,003)	2	2	0	2	0,27
VEN	4 /8	2	0,25 (0,18)	0,001 (0,002)	1	1	0	1	0,14
VIL	8 /16	2	0,50 (0,07)	0,003 (0,003)	1	1	1	0	0,27
VPJ	4 /8	2	0,54 (0,12)	0,003 (0,003)	1	1	1	0	0,29

**ANEXO VI.** Medidas de variabilidad intrapoblacional para Hormogastridae en las distintas localidades basada en el fragmento nuclear H4. Los valores entre paréntesis indican la varianza. N, número de individuos recogidos en cada población / número de alelos; NHAP, número de haplotipos diferentes encontrados en una localidad; *H*, diversidad haplotípica;  $\pi$ , diversidad nucleotídica; *S*, número de posiciones polimórficas; Sust, sustituciones; Ts, número de transiciones; Tv, número de transversiones; K2P, valores de divergencia genética intrapoblacional calculada mediante el modelo de Kimura 2-parámetros y expresada como porcentaje de cambios. Véase el nombre de la localidad completo en la Tabla VI.1.

## ANEXO VII

Divergencia genética media (K2P, en porcentaje de cambios) entre pares de poblaciones de hormogástridos, obtenidas a partir de los datos de COI. Se incluyó *A. trapezoides* (AT) como referencia.

	RED	VEN	JAR	MOL	TRE	CAB	NAV	LOZ	UCE	FRE	ANC	SIG	SOT	BOA	SEV	PAR	MND	GHI	ALG	IGL	TES	XAN	ALE	TOR	BIO	CER	QUE	UIX	TAL	LOP	GRA	PRB	MON	OEL	MAJ	SAN	BRU	BSM	QLL	SGF	VPJ	AT	ORD	VIL	LAC	PIG										
RED	3.90																																																							
VEN	2.05	2.08																																																						
JAR	3.50	1.45	1.45																																																					
MOL	5.84	5.69	6.08	1.03																																																				
TRE	4.37	4.55	5.69	3.45	4.77																																																			
CAB	9.64	10.49	10.81	12.38	10.79	0.00																																																		
NAV	10.15	10.60	11.46	11.19	10.09	4.00	0.22																																																	
LOZ	10.83	11.34	11.53	13.11	10.86	5.00	4.73	1.60																																																
UCE	12.75	13.52	14.35	16.39	14.15	17.95	17.15	17.67	0.99																																															
FRE	11.57	11.94	12.15	12.65	12.04	15.33	14.18	14.95	16.41	3.67																																														
ANC	14.91	15.34	15.23	16.93	14.89	16.29	16.96	17.22	18.75	16.37	0.27																																													
SIG	12.85	14.54	14.48	15.19	12.71	17.70	17.82	17.28	19.19	15.51	15.22	0.92																																												
SOT	14.05	15.19	15.48	15.88	13.31	18.45	17.92	17.59	19.64	15.37	15.73	2.03	0.32																																											
BOA	17.52	18.46	18.96	19.99	16.72	18.99	19.30	18.88	22.06	20.15	17.81	19.71	18.95	0.10																																										
SEV	16.58	17.59	17.83	20.19	17.28	20.07	19.36	18.46	21.04	17.95	17.06	18.30	18.57	6.55	0.17																																									
PAR	17.72	18.88	19.89	18.97	16.05	20.27	19.31	19.57	19.94	19.86	18.31	17.97	18.73	10.99	11.41	0.25																																								
MND	15.01	16.11	16.10	16.75	13.59	16.53	16.71	17.06	19.30	15.90	17.26	16.43	16.69	15.85	14.41	14.71	7.06																																							
GHI	15.44	16.29	17.41	19.13	17.14	18.87	18.26	18.23	20.70	18.71	20.94	18.06	17.78	21.68	20.72	18.43	15.41	0.76																																						
ALG	15.23	16.32	16.92	18.88	15.93	20.01	19.55	18.90	21.04	18.37	21.50	18.24	18.92	21.57	20.78	20.87	17.01	12.64	0.00																																					
IGL	19.49	21.06	22.06	21.93	19.17	22.06	20.87	21.28	22.34	17.84	21.38	20.64	21.04	21.31	20.54	18.15	17.33	16.07	16.56	0.32																																				
TES	17.84	18.57	19.38	19.93	17.62	18.65	19.25	19.17	21.04	17.32	19.82	17.44	17.44	18.78	17.94	17.41	17.52	18.50	19.74	18.79	0.79																																			
XAN	18.19	19.39	19.86	21.02	18.31	21.25	20.42	20.99	22.37	20.85	20.77	21.89	20.85	21.26	20.92	19.13	17.50	18.85	17.52	19.34	17.85	0.37																																		
ALE	19.60	20.06	20.23	20.87	18.36	20.07	21.07	22.04	23.21	21.41	19.73	20.94	21.34	18.64	18.82	17.45	17.38	17.72	19.34	18.95	17.32	20.74	0.00																																	
TOR	18.44	19.80	19.56	20.70	18.34	21.40	20.62	21.57	22.59	19.93	21.26	21.78	21.39	20.86	20.69	19.76	17.89	17.54	18.60	21.14	17.92	19.89	10.15	0.33																																
BIO	23.63	23.81	24.07	25.63	21.63	24.58	23.64	23.95	24.41	23.87	23.20	23.15	24.37	26.71	25.24	20.16	18.16	20.65	21.43	20.63	19.88	20.78	19.04	19.96	0.10																															
CER	20.01	20.50	20.88	21.36	19.40	20.50	19.55	20.83	24.06	21.11	21.09	22.58	22.68	21.98	22.48	20.64	16.96	19.20	20.80	21.93	17.65	19.15	15.26	15.80	17.96	1.14																														
QUE	18.97	19.95	20.31	21.39	19.44	20.81	19.82	20.92	22.03	20.83	19.89	20.94	21.53	20.29	19.90	18.80	16.97	17.63	19.45	20.62	16.55	19.22	16.12	16.17	16.68	5.19	1.18																													
UIX	19.04	19.68	20.08	21.85	19.75	21.43	20.74	22.04	23.45	20.60	19.07	22.33	22.10	22.58	21.10	21.81	16.65	17.22	20.14	22.42	17.28	20.30	16.15	16.18	18.03	7.50	6.72	0.86																												
TAL	18.68	18.83	18.77	20.18	19.24	19.76	20.20	21.21	21.66	19.61	20.20	22.00	22.21	22.74	22.54	21.10	17.21	19.07	19.74	21.47	17.61	20.13	15.25	15.55	18.81	6.61	7.79	7.70	0.00																											
LOP	17.82	17.99	18.23	19.14	17.00	19.04	17.63	18.71	20.80	17.25	18.15	20.86	21.33	21.26	20.35	19.11	16.41	17.28	18.24	20.41	18.28	18.83	17.15	16.58	18.38	8.45	8.13	9.61	10.12	0.10																										
GRA	18.82	19.22	19.16	20.92	18.29	19.54	19.10	20.19	21.81	19.10	21.81	21.21	21.77	22.48	19.72	17.56	18.54	20.39	20.85	16.45	18.93	16.21	17.19	16.18	12.07	13.49	13.79	13.96	11.35	0.47																										
PRB	18.61	18.75	19.32	20.00	18.12	20.31	18.51	19.87	21.62	18.04	18.04	19.95	20.32	22.57	21.74	18.58	17.87	18.52	19.30	20.34	15.58	18.18	15.74	16.40	15.96	10.70	12.64	11.63	12.04	9.53	6.05	0.62																								
MON	18.43	19.84	20.64	21.19	18.74	20.52	20.40	20.12	22.42	22.23	18.15	21.34	22.23	20.78	20.77	18.19	16.70	17.27	18.70	18.58	17.07	18.70	15.48	17.19	18.80	11.22	11.48	12.28	11.57	9.96	12.35	10.40	0.47																							
OEL	19.57	20.34	20.83	22.12	19.59	20.93	21.16	21.98	22.06	21.31	18.67	22.26	22.93	21.26	22.39	18.79	16.86	17.93	20.50	19.81	17.32	21.05	15.50	15.74	18.04	12.51	13.01	13.10	12.17	11.08	12.16	11.05	6.29	0.88																						
MAJ	20.26	21.05	21.53	21.00	19.33	20.72	19.94	20.40	22.72	21.81	20.70	22.01	23.02	22.02	19.82	20.27	19.13	22.35	22.02	20.20	20.59	22.49	19.70	21.19	22.10	17.66	16.14	17.69	18.35	16.34	19.25	16.99	15.98	17.65	0.47																					
SAN	18.61	19.66	20.55	21.66	18.74	20.21	19.84	19.84	21.67	19.53	19.93	20.90	20.11	22.21	21.14	18.33	17.50	18.57	22.99	20.83	19.98	22.19	20.46	18.02	18.26	16.76	17.02	18.41	18.89	16.79	17.20	15.64	18.23	18.04	12.67	0.10																				
BRU	19.42	19.88	20.93	21.71	18.94	20.94	19.92	20.42	23.86	21.5																																														

Véase nombre completo de las localidades en la Tabla VI.1

**Divergencia genética media (K2P, en porcentaje de cambios) entre pares de poblaciones de hormogástridos, obtenidas a partir de los datos de 16S. Se incluyó *A. trapezoides* (AT) como referencia.**

Véase nombre completo de las localidades en la Tabla VI.1

## ANEXO IX

**Divergencia genética media (K2P, en porcentaje de cambios) entre pares de poblaciones de hormogástridos, obtenidas a partir de los datos de H3. Se incluye *A.trapezoides* (AT) como referencia**

	ALE	TOR	BIO	CER	QUE	UIX	GRA	TAL	PRB	LOP	MON	OEL	TRE	VEN	RED	JAR	MOL	FRE	SIG	SOT	CAB	UCE	LOZ	NAV	ANC	BOA	SEV	PAR	GHI	ALG	IGL	TES	VPJ	XAN	LAC	MND	ORD	HPA	VIL	PIG	SGF	MAJ	SAN	BRU	BSM	QLL	AT																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
ALE	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
TOR	0,00	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
BIO	0,65	0,65	0,16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
CER	0,92	0,92	0,95	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
QUE	0,92	0,92	0,95	0,00	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
UIX	1,23	1,23	1,27	0,31	0,31	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
GRA	0,61	0,61	0,65	0,31	0,31	0,61	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
TAL	0,61	0,61	0,65	0,31	0,31	0,61	0,00	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
PRB	0,92	0,92	0,95	0,61	0,61	0,92	0,31	0,31	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
LOP	0,76	0,76	0,79	0,45	0,45	0,76	0,14	0,14	0,45	0,33																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
MON	0,92	0,92	0,96	0,61	0,61	0,92	0,31	0,31	0,61	0,19	0,08																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
OEL	0,92	0,92	0,95	0,61	0,61	0,92	0,31	0,31	0,61	0,25	0,00	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
TRE	3,36	3,36	4,05	3,69	3,69	4,01	3,36	3,36	3,69	3,52	3,69	3,69	0,31																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
VEN	3,38	3,38	4,06	3,70	3,70	4,03	3,38	3,38	3,70	3,54	3,70	3,70	0,05	0,51																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
RED	3,77	3,77	4,13	3,77	3,77	4,10	3,45	3,45	3,77	3,61	3,77	3,77	0,13	0,11	0,51																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
JAR	3,17	3,17	3,86	3,50	3,50	3,82	3,18	3,18	3,50	3,33	3,50	3,50	0,01	0,01	0,17	0,60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									
MOL	3,60	3,60	4,28	3,92	3,92	4,25	3,60	3,60	3,92	3,76	3,93	3,92	0,18	0,10	0,21	0,13	0,35																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
FRE	3,33	3,33	4,01	3,65	3,65	3,98	3,33	3,33	3,65	3,49	3,66	3,65	0,36	0,10	0,36	0,17	0,22	0,20																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
SIG	2,92	2,92	3,60	3,24	3,24	3,56	2,92	2,92	3,24	3,08	3,24	3,24	0,65	0,72	1,04	0,52	0,94	0,78	0,47																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																						
SOT	2,93	2,93	3,44	3,09	3,09	3,41	2,77	2,77	3,09	2,92	3,09	3,09	0,66	0,67	0,97	0,47	0,89	0,63	0,39	0,29																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
CAB	2,71	2,71	3,38	3,03	3,03	3,35	2,71	2,71	3,03	2,86	3,03	3,03	0,60	0,62	0,99	0,42	0,83	0,58	0,33	0,19	0,25																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																				
UCE	3,46	3,46	4,15	3,79	3,79	4,11	3,46	3,46	3,79	3,62	3,79	3,79	1,81	1,83	2,21	1,63	2,05	1,78	1,53	1,38	1,17	0,26																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
LOZ	2,88	2,88	3,56	3,20	3,20	3,52	2,88	2,88	3,20	3,04	3,20	3,20	0,75	0,82	1,14	0,63	1,04	0,90	0,60	0,50	0,13	1,34	0,42																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
NAV	2,80	2,80	3,47	3,11	3,11	3,43	2,80	2,80	3,11	2,95	3,11	3,11	0,85	0,86	1,24	0,66	1,07	0,82	0,57	0,43	0,07	1,26	0,07	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
ANC	3,03	3,03	3,71	3,35	3,35	3,67	3,03	3,03	3,35	2,76	3,27	3,35	1,90	1,91	2,30	1,71	2,13	1,87	1,46	1,47	1,26	2,31	1,43	1,35	0,16																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
BOA	4,72	4,72	5,42	5,38	5,38	5,05	5,05	5,05	5,38	5,21	5,28	5,38	3,69	3,71	4,10	3,50	3,93	3,66	3,41	2,85	2,99	3,79	2,97	3,11	4,20	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
SEV	4,07	4,07	4,76	4,72	4,72	4,39	4,39	4,39	4,72	4,56	4,72	4,72	3,37	3,38	3,78	3,18	3,60	3,34	2,92	2,53	2,67	3,47	2,65	2,80	3,23	0,92	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																														
PAR	4,02	4,02	4,71	4,67	4,67	4,34	4,34	4,34	4,67	4,51	4,67	4,67	3,24	3,23	3,62	3,05	3,45	3,18	2,71	2,48	2,62	3,42	2,60	2,74	3,18	1,59	0,66	0,43																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
GHI	4,02	4,02	4,64	4,73	4,73	5,05	4,40	4,40	4,73	4,44	4,69	4,73	5,98	6,00	6,07	5,62	6,22	5,94	5,52	4,95	5,25	6,08	5,23	5,38	5,50	6,03	5,37	5,33	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												
ALG	5,05	5,05	4,96	5,05	5,05	5,38	4,72	4,72	5,05	4,67	5,01	5,05	5,65	5,67	5,74	5,29	5,90	5,61	5,19	4,62	4,93	5,75	4,91	5,05	5,17	5,71	5,05	5,00	0,31	0,00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											</

Véase nombre completo de las localidades en la Tabla VI.

## ANEXO X

**Divergencia genética media (K2P, en porcentaje de cambios) entre pares de poblaciones de hormogástridos, obtenidas a partir de los datos de H4 Se incluye *A. trapezoides* (AT) como referencia**

	P	G	A	T	A	N	C	S	I	G	S	O	T	F	R	E	J	A	R	L	O	Z	M	O	L	N	A	V	R	E	D	T	R	E	C	A	B	V	E	N	B	O	A	S	E	V	P	A	R	A	L	E	T	O	R	D	V	I	L	U	I	X	T	A	L	S	A	N	Q	U	E	M	O	N	C	E	R	G	R	A	L	O	P	M	O	N	P	R	B	O	E	L	G	H	I	I	G	L	T	E	S	V	P	J	S	G	F	X	A	N	B	I	O	B	R	U	B	A	N	Q	L	L	A	C	M	N	D	U	C	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
P	I	G	A	T	A	N	C	S	I	G	S	O	T	F	R	E	J	A	R	L	O	Z	M	O	L	N	A	V	R	E	D	T	R	E	C	A	B	V	E	N	B	O	A	S	E	V	P	A	R	A	L	E	T	O	R	D	V	I	L	U	I	X	T	A	L	S	A	N	Q	U	E	M	O	N	C	E	R	G	R	A	L	O	P	M	O	N	P	R	B	O	E	L	G	H	I	I	G	L	T	E	S	V	P	J	S	G	F	X	A	N	B	I	O	B	R	U	B	A	N	Q	L	L	A	C	M	N	D	U	C	E																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
A	T	9.88	0.00																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												

Véase nombre completo de las localidades en la Tabla VI.1

**ANEXO XI.** Nuevos cálculos de los tiempos de expansión para el capítulo IV a la luz de las nuevas tasas de sustitución del gen COI, calculadas para hormogástridos y concretamente para el clado de *Hormogaster elisae* en el capítulo VI.

Tras la calibración del árbol elaborado para hormogástridos, en el capítulo VI se ha calculado la tasa de sustitución para el gen COI en este grupo. Se ha encontrado gran variación dentro de la Familia, por lo que esta tasa se ha calculado por clados. A la luz de los resultados obtenidos, se proporciona un nuevo cálculo de los tiempos de expansión del análisis demográfico perteneciente al capítulo IV, basado en la tasa de sustitución específica para el clado de *Hormogaster elisae*. Debido a la variación que se observa también dentro de este clado, se han realizado los cálculos utilizando el valor medio, el máximo y el mínimo, de esta tasa de sustitución. En primer lugar se calculó la media para estos valores de los resultados obtenidos como consecuencia de utilizar los árboles elaborados con distintos programas (MRBAYES y POY, Tabla A.XI.1). En la Tabla A.XI.2 se muestran los nuevos cálculos.

	<i>H.elisae</i> (37ma_MRBAYES)	<i>H.elisae</i> (42ma_POY)	Tasa Media MRBAYES-POY	Divergencia
<b>Media</b>	2,887 %	2,543 %	2,715 %	5,43 %
<b>Mínimo</b>	0,314 %	0,276 %	0,295 %	0,59 %
<b>Máximo</b>	17,65 %	15,55 %	16,6 %	33,2 %

**Tabla A.XI.1.** Tasas de sustitución del gen COI por posición y millón de años calculadas para el clado de *Hormogaster elisae* y a partir de las fechas de los árboles generales, generadas por distintos análisis. Se indica en la fila superior la fecha que se incluyó como restricción y el programa que generó esa fecha para ese clado. A continuación, la media de los valores resultantes y en la última columna se indica el valor de divergencia equivalente. ma: millones de años

Parámetros	Anchuelo	Pardo	Sevilla N	Siguero
$\tau$	2,08	2,15	0,74	11,79
Con Media	29.600	30.600	10.500	167.500
Con mínimo	272.000	281.200	96.800	1.541.900
Con máximo	4.700	5.000	1.700	27.400
Con tasa de Chang y Chen (2005)	22.900	23.700	8.200	130.000

**Tabla A.XI.2.** Parámetros de genética poblacional estimados por el análisis de Mismatch bajo un modelo de expansión repentina. Se calculó de nuevo el tiempo en el que se produjo la expansión, asumiendo una generación por año y el valor de tasa de mutación calculado para *H. elisae*.



Se observa una enorme variabilidad en los resultados y es difícil sacar conclusiones claras. Cuando se utiliza el valor medio, las estimas son similares a aquellas que se calcularon en el capítulo IV. En cualquier caso la afirmación que se hizo en ese capítulo sobre una expansión más antigua en Sigüero sigue siendo cierta. Queda claro que hay que actuar con cautela a la hora de interpretar los resultados derivados de los cálculos de las tasas de sustitución, ya que estas son muy variables, al menos en el clado de *H. elisae*. Futuras investigaciones sobre la evolución de este clado nos darán más información al respecto.